

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1978 - N° 153

THÈSE

présentée

A l'Université Claude Bernard - Faculté de Pharmacie

et soutenue publiquement le 18 Septembre 1978

pour obtenir le grade de Docteur d'Etat es Sciences Pharmaceutiques

par

Patrick MASSON

né le 3 Janvier 1948

à COURBEVOIE (Hauts de Seine)

FORMES MOLECULAIRES MULTIPLES ET STRUCTURE
QUATERNAIRE DE LA BUTYRYLCHOLINESTERASE
DU SERUM HUMAIN/

JURY Mr A. REVOL
 Mr J. AGNERAY
 Mr P. LOUISOT
 Mr C. QUINCY
 Mr P. MORELIS

20



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554217_0022

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1976 - 1977

THÈSE

présentée

à l'Université Claude Bernard - Faculté de Pharmacie

et soutenue publiquement le 16 Septembre 1976

pour obtenir le grade de Docteur d'État en Sciences Pharmaceutiques

par

FRÉDÉRIC MARTEL

né le 1 Janvier 1950

à COGNAC (Charente-Maritime)

FORMES MOLECULAIRES MULTIPLES ET STRUCTURE
QUATERNAIRE DE LA BUTYRYLCHOLINESTERASE
DU SÉRUM HUMAIN

Directeur : M. A. SIVOL

M. J. ACHILLAT

M. A. LOISEL

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1978 - N° 153

THÈSE

présentée

A l'Université Claude Bernard - Faculté de Pharmacie

et soutenue publiquement le 18 Septembre 1978

pour obtenir le grade de Docteur d'Etat es Sciences Pharmaceutiques

par

Patrick MASSON

né le 3 Janvier 1948

à COURBEVOIE (Hauts de Seine)

FORMES MOLECULAIRES MULTIPLES ET STRUCTURE QUATERNAIRE DE LA BUTYRYLCHOLINESTERASE DU SERUM HUMAIN/

JURY Mr A. REVOL
 Mr J. AGNERAY
 Mr P. LOUISOT
 Mr C. QUINCY
 Mr P. MORELIS

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD (LYON I)

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1972 - 1973

THÈSE

présentée

à l'Université Claude Bernard - Faculté de Pharmacie

et soutenue publiquement le 15 septembre 1972

pour obtenir le grade de Docteur à Paris et à Lyon Pharmaciens

par

Patrick MASSON

né le 1 janvier 1948

à Gournay (Seine-et-Marne)



FORMES MOLÉCULAIRES AGUÏNÉES ET STÉRÉOTYPIE
QUATERNAIRES DE LA BUTYRYLCHOLINESTÉRASE
DU SÉRUM HUMAIN

JURY :
MR. A. DEVOE
MR. J. ADRIAN
MR. H. LANGE
MR. G. QUINCY
MR. R. M. H. H. H.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

PRESIDENT : M. le Professeur D. GERMAIN

PREMIER VICE-PRESIDENT : M. le Professeur ELBAZ

DEUXIEME VICE-PRESIDENT : M. P. PONCET, Maître-Assistant

TROISIEME VICE-PRESIDENT : M. C. BADOR, Etudiant

SECRETAIRE GENERAL DE L'UNIVERSITE : M. J. RAMBAUD, Administrateur Civil

DIRECTEURS DES U.E.R. ET DOYENS DES FACULTES

FACULTE DE MEDECINE GRANGE-BLANCHE : Monsieur Bernard SALLE, M.C.A.

FACULTE DE MEDECINE ALEXIS-CARREL : Monsieur le Pr René MORNEX

U.E.R. DE MEDECINE LYON-NORD : Monsieur Jean Pierre NEIDHART, M.C.A.

FACULTE DE MEDECINE SUD-OUEST : Monsieur le Pr Jean NORMAND

FACULTE DE PHARMACIE : Monsieur le Pr Charles-Albert BIZOLLON

U.E.R. DE TECHNIQUES DE READAPTATION : Monsieur Alain MORGON, M.C.A.

U.E.R. DE BIOLOGIE HUMAINE : Monsieur Jean Pierre REVILLARD, M.C.A.

U.E.R. I.R.E.P.S. : Monsieur Albert MILLON, Professeur d'E.P.S.

U.E.R. DE SCIENCES ODONTOLOGIQUES : Monsieur le Dr Roger VINCENT

U.E.R. DE MATHÉMATIQUES : Monsieur le Pr Edmond COMBET

U.E.R. DE PHYSIQUE : Monsieur le Pr Jean DELMAU

U.E.R. DE CHIMIE-BIOLOGIE : Monsieur le Pr Jean HUET

U.E.R. DE SCIENCES DE LA NATURE : Monsieur le Pr René GINET

U.E.R. DE SCIENCES PHYSIOLOGIQUES : Mademoiselle le Pr Jeanne-Françoise WORBE

U.E.R. DE PHYSIQUE-NUCLEAIRE : Monsieur le Professeur Mark GUSAKOW

I.U.T. n° 1 : Monsieur le Pr Bernard POUYET

I.U.T. n° 2 : Monsieur J. GALLET, Directeur E.N.S.A.M.

OBSERVATOIRE DE LYON : Monsieur Guy MONNET, Astronome Adjoint

U.E.R. DE MECANIQUE : Mademoiselle le Pr Geneviève COMTE-BELLOT

A JACQUELINE .

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur André REVOL

Professeur de Biochimie

à la Faculté de Pharmacie de Lyon

Biologiste des Hôpitaux

(Hôpital STE EUGENIE, SAINT-GENIS-LAVAL)

Qu'il trouve ici le témoignage de
notre attachement et de notre reconnaissance .



AUX MEMBRES DE NOTRE JURY

Monsieur le Professeur J. AGNERAY

Professeur de Biochimie à la Faculté de Pharmacie
de Chatenay-Malabry (Université Paris XI)
Biologiste des Hôpitaux (Hôpital Hérold, Paris)

Monsieur le Professeur P. LOUISOT

Professeur de Biochimie à la Faculté de Médecine
de Lyon (U.E.R. de Médecine Lyon Sud-Ouest)
Biologiste des Hôpitaux (Hôpital Cardiologique,
Lyon)

Monsieur le Professeur C. QUINCY

Professeur de Chimie analytique
Biologiste des Hôpitaux (Hôpital Neurologique,
Lyon)

Monsieur le Médecin en Chef P. MORELIS

Spécialiste de Recherche du Service de Santé
des Armées
Chef de la Division de Chimie et Pharmacologie
du Centre de Recherches du Service de Santé des
Armées

A TOUS CEUX QUI NOUS ONT AIDE A REALISER CE TRAVAIL

Monsieur le Médecin en Chef FONTANGES
Maître de Recherches
du Service de Santé des Armées
Chef de la Division de Microbiologie
du Centre de Recherches
du Service de Santé des Armées

Messieurs André CACHARD et Bruno DAVID

Madame CHALEARD pour la patience dont elle a
fait preuve et pour l'excellente qualité ty-
pographique de son travail

Madame ASTIER qui a eu la redoutable tâche
d'effectuer le tirage

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES -----	I
ABREVIATIONS ET SYMBOLES -----	X
INTRODUCTION -----	1
TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE	
 <u>CHAPITRE I - GENERALITES ET BIOLOGIE DE LA BUTYRYLCHOLINES-</u> <u>TERASE DU SERUM HUMAIN</u> -----	9
1. <u>Les estérases du sérum</u> -----	9
1.1. Classification des estérases du sérum -----	9
1.2. Limites de la classification d'AUGUSTINSSON -----	10
1.3. Relation de la BuChE avec les autres estérases sériques --	11
2. <u>Nomenclature et classification des cholinestérases</u> -----	12
2.1. Les Acétylcholinestérases -----	12
2.2. Les Butyrylcholinestérases -----	13
3. <u>Nature chimique des Butyrylcholinestérases</u> -----	13
3.1. Analyse centésimale de la copule glucidique -----	13
3.2. Analyse centésimale de la partie protéique -----	14
4. <u>Origine de la cholinestérase plasmatique</u> -----	15
5. <u>Les autres Butyrylcholinestérases de l'organisme</u> -----	17
5.1. Milieu intérieur -----	17
5.2. Tissus -----	17

6. <u>Implication de la cholinestérase en physiopathologie et en toxicologie</u> -----	18
6.1. Le taux normal plasmatique -----	18
6.2. Variations physiologiques -----	19
6.3. Variations pathologiques -----	21
7. <u>Rôle Biologique</u> -----	24
7.1. Relations possibles entre BuChE et AChE -----	25
7.2. Implication dans le métabolisme de l'acétylcholine -----	25
7.3. Butyrylcholinestérase et lipoprotéines plasmatiques -----	26
 <u>CHAPITRE II - PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES ET CATALYTIQUES</u> ----	29
1. <u>Propriétés moléculaires</u> -----	29
2. <u>Propriétés moléculaires de l'enzyme purifiée</u> -----	30
3. <u>Constitution et topographie du centre actif des cholinestérases</u> 33	
3.1. Le centre actif des cholinestérases -----	33
3.2. Constitution du centre actif de l'acétylcholinestérase ---	33
3.3. Différences entre Acétylcholinestérase et Butyrylcholines- térase -----	35
4. <u>Mécanisme de l'hydrolyse</u> -----	36
5. <u>Inhibiteurs de l'activité</u> -----	38
5.1. Inhibiteurs compétitifs -----	38
5.2. Inhibiteurs non compétitifs -----	39
 <u>CHAPITRE III - HETEROGENEITE</u> -----	47
1. <u>Bases moléculaires de l'hétérogénéité des protéines</u> -----	48
1.1. Formes génétiquement déterminées -----	48
1.2. Formes déterminées par des facteurs épigénétiques -----	49

1.3. Structure quaternaire -----	55
1.4. Rôle et signification biologique -----	66
2. <u>Hétérogénéité moléculaire de la butyrylcholinestérase du sérum-</u>	69
2.1. L'hétérogénéité électrophorétique, reflet de l'hétérogénéité moléculaire -----	69
2.2. La complexité croissante du problème -----	71
2.3. La recherche d'une explication moléculaire -----	73
2.4. La nature oligomérique de la BuChE -----	75
3. <u>Hétérogénéité catalytique</u> -----	79
3.1. Théorie moléculaire -----	79
3.2. Théorie des sites différents -----	82
3.3. Théorie allostérique -----	82
4. <u>Hétérogénéité génétique</u> -----	85
4.1. Le variant atypique -----	86
4.2. Le variant résistant au fluorure -----	89
4.3. Le variant silencieux -----	89
4.4. Le variant C ₅ ⁺ -----	89
4.5. Les autres variants -----	91

MATERIELS ET METHODES

<u>CHAPITRE I - PRINCIPES METHODOLOGIQUES</u> -----	93
<u>CHAPITRE II - SOURCE DE L'ENZYME</u> -----	95
<u>CHAPITRE III - MESURE DE L'ACTIVITE</u> -----	97
1. <u>Mesures au pH-stat</u> -----	98
2. <u>Mesures par la méthode d'ELLMAN</u> -----	99

CHAPITRE IV -	MISE EN EVIDENCE DE L'HETEROGENEITE MOLECULAIRE	103
1.	<u>Technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide</u>	103
2.	<u>Chromatographie d'exclusion</u>	116
CHAPITRE V -	DETERMINATION DES PARAMETRES MOLECULAIRES	123
1.	<u>Détermination des masses moléculaires apparentes des différentes formes</u>	124
1.1.	Méthode d'Hedrick & Smith	124
1.2.	Méthode de Margolis & Kenrick	127
1.3.	Méthode de Manwell	129
2.	<u>Détermination de la masse moléculaire du monomère</u>	132
3.	<u>Détermination des constantes de sédimentation apparentes</u>	142
4.	<u>Détermination du volume spécifique partiel apparent</u>	147
4.1.	Détermination par ultracentrifugation	147
4.2.	Détermination à partir de la composition en glucides et en aminoacides	149
5.	<u>Détermination du point isoélectrique</u>	150
5.1.	Détermination par électrofocalisation en gel de polyacrylamide	151
5.2.	Calcul théorique	155
6.	<u>Détermination de la mobilité électrophorétique libre</u>	161
CHAPITRE VI -	DETERMINATION DES PARAMETRES FONCTIONNELS APPARENTS	167
1.	<u>Principe</u>	167
2.	<u>Mode opératoire</u>	168
3.	<u>Problèmes posés par l'immobilisation de l'enzyme dans le gel de polyacrylamide</u>	169
3.1.	Modification des propriétés de l'enzyme	169
3.2.	Effet du partage et de la diffusion du substrat	170

<u>CHAPITRE VII - CONCENTRATION ET SITES ACTIFS</u>	177
<u>CHAPITRE VIII- APPROCHE DE LA GEOMETRIE MOLECULAIRE</u>	181
1. <u>Rayons moléculaires</u>	182
1.1. Rayon de la sphère équivalente anhydre	182
1.2. Rayon de STOKES	184
2. <u>Rapport de friction</u>	185
3. <u>Modèles moléculaires</u>	188
3.1. Modèle de PERRIN	189
3.2. Modèle de KIRKWOOD	190
<u>CHAPITRE IX - DETERMINATION DE LA NATURE DES INTERACTIONS ENTRE LES SOUS-UNITES</u>	193
1. <u>Préparation des formes isolées</u>	194
2. <u>Recherche de l'interconvertibilité</u>	195
3. <u>Action du β-mercaptoéthanol</u>	195
4. <u>Variation de la force ionique du tampon circulant</u>	196
5. <u>Variation du pH et de la force ionique</u>	196
6. <u>Action des solvants organiques</u>	197
7. <u>Action des ultrasons</u>	199
<u>CHAPITRE X - MODIFICATIONS ENZYMATIQUES</u>	201
1. <u>Action de la trypsine</u>	201
2. <u>Action de la neuraminidase</u>	203
3. <u>Action des phospholipases</u>	204
3.1. Principe	205
3.2. Phospholipases A ₂	206

3.3. Phospholipases C -----	207
3.4. Phospholipase D -----	207
4. <u>Recherche des protéases dans les préparations</u> -----	208

RESULTATS

CHAPITRE I - <u>MISE EN EVIDENCE DE L'HETEROGENEITE MOLECULAIRE</u> --	211
--	-----

1. <u>Electrophorèse annulaire en gel de polyacrylamide</u> -----	211
2. <u>Filtration sur gel</u> -----	214

CHAPITRE II - <u>DETERMINATION DES PARAMETRES MOLECULAIRES</u> -----	217
--	-----

1. <u>Masses moléculaires des différentes formes</u> -----	217
2. <u>Masse moléculaire du monomère</u> -----	232
3. <u>Volume spécifique partiel</u> -----	235
3.1. Calcul théorique -----	235
3.2. Volume spécifique partiel expérimental -----	237
4. <u>Constantes de sédimentation</u> -----	238
5. <u>Points isoélectriques</u> -----	241
6. <u>Mobilité électrophorétique</u> -----	249
6.1. Mobilité libre relative -----	249
6.2. Mobilité libre absolue -----	249

CHAPITRE III - APPROCHE DE LA GEOMETRIE MOLECULAIRE -----	253
1. <u>Rayon des sphères équivalentes : $\bar{R}$</u> -----	253
2. <u>Rayons de STOKES : R_S</u> -----	255
3. <u>Rapports de friction</u> -----	255
4. <u>Hypothèses sur la forme et le taux d'hydratation</u> -----	255
5. <u>Corrélation des données de l'électrophorèse avec celles de la centrifugation</u> -----	260
6. <u>Modèles de Perrin</u> -----	263
7. <u>Modèles de Kirkwood</u> -----	266
 CHAPITRE IV - DETERMINATION DES CONSTANTES DE MICHAELIS ET DES VITESSES MAXIMA APPARENTES -----	269
1. <u>Résultats</u> -----	269
2. <u>Interprétation</u> -----	272
 CHAPITRE V - LA QUESTION DU NOMBRE DE SITES ACTIFS ET DE LA CONCENTRATION DE CHAQUE ESPECE ENZYMATIQUE -----	275
1. <u>Détermination du nombre de sites à partir de la concentration en enzyme</u> -----	275
2. <u>Approche du problème</u> -----	278
 CHAPITRE VI - NATURE DES INTERACTIONS ENTRE LES SOUS-UNITES -	283
1. <u>Interconvertibilité des formes</u> -----	283
2. <u>Variations de la force ionique du tampon</u> -----	285
3. <u>Existence de ponts disulfures intermonomériques</u> -----	288
4. <u>Variation du pH et de la force ionique</u> -----	289

5. <u>Action des solvants organiques sur l'état d'agrégation</u> -----	291
6. <u>Action des ultrasons sur l'état d'agrégation</u> -----	291
7. <u>Réexamen du nombre de sites actifs par tétramère</u> -----	297

CHAPITRE VII - <u>MODIFICATIONS ENZYMATIQUES</u> -----	299
--	-----

1. <u>Action de la neuraminidase</u> -----	299
2. <u>Action de la trypsine</u> -----	305
3. <u>Action des phospholipases</u> -----	310

CHAPITRE VIII - <u>OBSERVATIONS SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE</u> ----	317
--	-----

1. <u>Nombre théorique d'acides aminés</u> -----	317
2. <u>Composition probable de la partie glucidique</u> -----	319
3. <u>Relations entre la composition en acides aminés et la structure de la BuChE</u> -----	322

DISCUSSION

1. <u>Hétérogénéité de la Butyrylcholinestérase du sérum humain</u> --	333
2. <u>Les formes permanentes</u> -----	334
2.1. Nature de l'hétérogénéité moléculaire -----	334
2.2. Approche de la géométrie moléculaire -----	335
2.3. Nombre de sites actifs -----	336
3. <u>Les formes inhabituelles</u> -----	339
3.1. Nature de C _{pré 1} -----	339
3.2. Nature de C _{pré 4} -----	340
3.3. Nature des conformères -----	341

4.	<u>Nature des liaisons entre les sous-unités</u>	343
4.1.	Interactions faibles	344
4.2.	Ponts disulfures	344
4.3.	Interconvertibilité des formes	347
5.	<u>Rôle de la partie glucidique et en particulier de l'acide N-acétylneuraminique</u>	348
5.1.	La partie glucidique	348
5.2.	L'acide N-acétylneuraminique	348
5.3.	Hypothèse sur la nature de la forme C ₂	350
5.4.	Origine de la forme C ₂	353
6.	<u>Interactions avec d'autres molécules</u>	356
6.1.	Interaction de la BuChE avec des phospholipides	356
6.2.	Interaction de la BuChE avec l' α_2 -macroglobuline	361
6.3.	Caractère peu vraisemblable d'une interaction de la BuChE avec l'albumine	362
7.	<u>Signification de l'existence du système de formes multiples</u>	363

CONCLUSION

365

BIBLIOGRAPHIE

367

A b r é v i a t i o n s

A	:	-----	Acrylamide
ACh	:	-----	Acétylcholine
AChE	:	-----	Acétylcholinestérase
BBPh	:	-----	Bleu de Bromophénol
BIS	:	-----	N,N'-méthylène-bis-acrylamide
B.M.	:	-----	Bain-marie
BuCh	:	-----	Butyrylcholine
BuChE	:	-----	Butyrylcholinestérase
BuSCh	:	-----	Butyrylthiocholine
DATD	:	-----	Diallyltartardiamide
DTNB	:	-----	Acide 5:5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)
HDL (high density lipoprotein)	:	-----	Lipoprotéine de haute densité
LDL (low density lipoprotéin)	:	-----	Lipoprotéine de faible densité
β -MCE	:	-----	β -mercaptoéthanol
NANA	:	-----	Acide N-acétylneuraminique
NANase	:	-----	Neuraminidase
N-EM	:	-----	N-éthylmaléimide
N-MIA	:	-----	N-méthylindoxylacétate
SAB	:	-----	Sérum albumine bovine
SDS	:	-----	Sodium dodecyl sulfate (lauryl sulfate de sodium)
TEMED	:	-----	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
VLDL (very low density lipoprotein)	--		Lipoprotéine de très faible densité

Principaux symboles employés

A_{λ}	:	Absorbance (densité optique)
$\text{\AA}$	:	Angström ($1 \text{\AA} = 10^{-8} \text{ cm}$)
a/b	:	Rapport axial
$C \%$	:	Taux de réticulation d'un gel de polyacrylamide
D	:	Constante de diffusion
e	:	Charge de l'électron : $4,8 \cdot 10^{-10} \text{ e.s.u.}$
E	:	Champ électrique
f	:	Coefficient de friction
f/fo	:	Rapport de friction
k	:	Constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-16} \text{ ergs/deg}$)
k_c	:	Constante catalytique
K_m	:	Constante de Michaelis
K_R	:	Coefficient de retardement
$\log$	:	Logarithme décimal
$\ln$	:	Logarithme népérien
M	:	Masse moléculaire
m	:	Mobilité électrophorétique
m_0	:	Mobilité électrophorétique libre
N_A	:	Nombre d'Avogadro ($6,03 \cdot 10^{23}$)
pI	:	Point isoélectrique
R	:	Constante des gaz parfaits
$\bar{R}$	:	Rayon de la sphère anhydre équivalente
R_S	:	Rayon de Stokes
S	:	Constante de sédimentation
$T^{\circ}K$	:	Température en degrés Kelvin
$T \%$	:	Concentration en monomères d'un gel de polyacrylamide
V_{max}	:	Vitesse maximum
Z	:	Charge électrique

Principales lettres grecques employées

ϵ	: Constante diélectrique
ζ	: Coefficient de friction moléculaire
η	: Viscosité (ν_* : incrément de viscosité)
θ	: Notation des angles
κ	: Paramètre de DEBYE-HÜCKEL
λ	: Longueur d'onde
μ	: Force ionique
$\bar{v}$	: Volume spécifique partiel
ρ	: Densité
σ	: Densité de charge
τ	: Temps de latence
ψ	: Potentiel
ω	: Taux d'hydratation

INTRODUCTION

C'est en septembre 1971, alors que j'effectuais un stage post-universitaire dans la division de Chimie et Pharmacologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, que le Pharmacien-chimiste Général H. PHILIBERT qui était, à l'époque, le chef de cette division, me confia un travail portant sur les techniques d'étude des isoenzymes de la Butyrylcholinestérase du sérum humain, ainsi que la mise au point d'un procédé de purification de cette enzyme.

Après neuf mois de difficultés liées, en partie, à la faible concentration de l'enzyme dans le sérum, aux techniques utilisées peu spécifiques et donnant un faible rendement (la chromatographie d'affinité, d'invention récente, était encore peu pratiquée) et, enfin, à la perte de certaines isoenzymes au cours des différentes étapes de la purification, j'abandonnais ce deuxième volet pour me consacrer entièrement à l'élaboration d'une méthodologie permettant d'étudier efficacement les propriétés physicochimiques de ces isoenzymes, sans qu'une purification préalable soit nécessaire.

A l'époque, les isoenzymes suscitaient un vif intérêt. Leur découverte était encore récente; leur existence semblait universelle et, à mesure qu'on en découvrait de nouvelles, la complexité et l'incompréhension de leurs bases génétiques et moléculaires grandissaient. Les cholinestérases n'échappaient pas à la règle.

J'obtenais mes premiers résultats, lorsqu'il me fallut, en novembre 1972, quitter le Centre de Recherches pour l'Ecole d'Application du Service de Santé des Armées, à Paris, au Val-de-Grâce, puis, quelques mois plus tard, l'Institut de Médecine tropicale de Marseille. Nommé en

septembre 1973 adjoint au Chef du Laboratoire de Contrôle de la Pharmacie Centrale des Armées à Orléans, je ne pus reprendre efficacement mes recherches que dans le courant de l'année 1974, avec l'aide matérielle de chercheurs du Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans et le soutien du Médecin en Chef R. FONTANGES, avec lequel je préparais l'Assistanat de Recherches de Biochimie et Microbiologie.

Pendant cette période de quiétude, il m'avait cependant été possible de poursuivre mes recherches bibliographiques et, peu à peu, la manière dont je devais concevoir le sujet s'élaborait, s'affirmait.

Il fallait dépasser le stade du souffleur et tendre vers le Grand Oeuvre. Dominer la technique, s'en libérer après l'avoir maîtrisée et rechercher la nature profonde du phénomène, sinon sa cause.

Pour cela, il était nécessaire d'aborder la question des isoenzymes non plus sous l'angle descriptif et analytique qui ne pouvait déboucher que sur une impasse ou, au mieux, sur un résultat dans la lignée inflationniste de ceux qui firent croître le nombre d'isoenzymes de la cholinestérase du sérum humain de deux à quatre, puis à six et, enfin, à douze, sans résoudre le problème; il fallait l'intégrer dans une démarche globale de recherche des bases moléculaires et génétiques des formes multiples, en évitant une tendance trop excessive au réductionnisme ou à la modélisation, ainsi que les pièges du raisonnement par analogie.

Mais il régnait une certaine confusion dans la terminologie, dont il importait de s'affranchir. On parlait indifféremment de formes moléculaires multiples ou d'isoenzymes pour désigner les structures, certes tangibles, mais dont l'identité n'était pas encore établie. Les recommandations de la Commission de Nomenclature en Biochimie de l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée et de l'Union Internationale de Biochimie relatives à la nomenclature des formes multiples des enzymes (I.U.P.A.C. & I.U.B., 1971), en définissant, de façon précise, les divers niveaux de l'hétérogénéité ou du polymorphisme enzymatique, permirent que soit levé un certain nombre de confusions de langage. Le terme isoenzyme devant être réservé aux formes multiples génétiquement distinctes, ainsi qu'aux formes dont la nature ~~de~~ la multiplicité n'est pas connue, toutes les autres formes enzymatiques possédant la même activité catalytique et existant naturellement dans une même espèce devaient être désignées sous

le terme de "formes multiples".

En 1974, bien que la nature de la multiplicité de la Butyrylcholinestérase ne soit pas encore exactement connue, il était raisonnable de considérer, par référence aux travaux antérieurs ou en cours, que l'hétérogénéité de cette enzyme n'était pas soumise à un déterminisme génétique (il convient cependant de mentionner l'existence de variants génétiques qui, isoenzymes vraies, viennent se surajouter, lorsqu'ils sont présents, à l'hétérogénéité de l'enzyme normale), mais semblait plutôt la conséquence de plusieurs phénomènes post-transcriptionnels, épigénétiques.

L'axe central de notre travail fut donc la détermination de la nature de la multiplicité enzymatique. Sans écarter l'hypothèse qu'elle pouvait résulter de causes multiples : interaction avec d'autres protéines, conjugaison à de petites molécules, dégradation partielle, polymérisation d'une sous-unité monomérique, existence de plusieurs conformations stables, les données de la littérature suggéraient que les formes multiples, que l'on détectait par filtration sur gel ou électrophorèse, devaient représenter une séquence d'homopolymères ; en d'autres termes, constituer les différents niveaux hiérarchiques d'une structure quaternaire. C'est donc sur cette hypothèse initiale que notre travail s'est organisé.

Cependant, alors que les recherches sur la structure de la Butyrylcholinestérase semblaient piétiner depuis 1970 [LA MOTTA et al. (1970) et BOUTIN & BRODEUR (1971)], d'importants travaux relatifs à la structure de l'Acétylcholinestérase de l'Organe électrique d'*Electrophorus electricus* étaient publiés, en 1974, par ROSENBERRY et al. et par DUDAI & SILMAN. En nous gardant bien de voir une identité structurale là où il n'y avait peut-être qu'une lointaine parenté, l'étude comparative des données structurales et la transposition, sur notre enzyme, d'essais pratiqués sur l'acétylcholinestérase par ces deux équipes, révélèrent de troublantes analogies.

L'intégration de ces nouvelles données nous permit d'examiner le sujet sous un jour nouveau et de mettre au point une méthodologie propre à établir les liens de parenté ou les rapports d'analogie pouvant unir ces deux enzymes tout en restant dans l'esprit de notre hypothèse

initiale.

Après la mise en évidence de l'hétérogénéité moléculaire de notre enzyme et de la relation ordinale unissant ses différentes composantes dans nos deux systèmes expérimentaux, l'étude des mobilités électrophorétiques relatives en gel de polyacrylamide et la démonstration que ces formes étaient toutes issues d'un monomère commun actif nous permirent de passer à la fonction cardinale de chacune d'elles, d'envisager leur nature moléculaire et le mécanisme de leur polymérisation. Car, c'est bien sous l'aspect d'une séquence de polymères que les formes multiples de la butyrylcholinestérase nous apparurent tout d'abord.

Les importantes revues de KLOTZ (1970 et 1975) favorisèrent, chez nous, une perception et un abord dialectique du problème. En raison de l'existence simultanée de plusieurs formes moléculaires susceptibles de correspondre aux différents niveaux transitoires de la structure quaternaire, on pouvait s'attendre à ce que l'ensemble des formes coexistent dans un rapport dialectique qu'il devait être aisé de modifier et dont les lois seraient relativement simples à énoncer.

Nous en étions là vers la fin de 1975 lorsque, engagé dans la préparation de l'Assistanat de Recherches en Biochimie et Microbiologie, je dus interrompre, une fois de plus, mes travaux pendant plusieurs mois. C'est en septembre 1976, alors que je venais d'être nommé assistant dans cette même division que j'avais quittée quatre ans auparavant, que je pus reprendre mes recherches, sous la tutelle du Médecin en Chef P. MORELIS.

Poursuivant notre étude selon l'axe initialement tracé, nous déterminâmes les paramètres physicochimiques des différentes formes et, en parallèle, soumîmes le sérum à l'action d'agents perturbateurs de la structure tridimensionnelle, les ultrasons, les variations de la force ionique, de modificateurs chimiques et de différentes enzymes, protéase, neuraminidase, phospholipases, afin d'établir la nature des interactions qui déterminent la cohésion et la stabilité des différents édifices moléculaires.

Notre conception sur l'autodynamisme du système vint à se modifier quelque peu par la mise en évidence de ponts disulfures reliant les monomères entre eux et qui, bien que spontanément (dans une certaine me-

sure) réductibles, imposent une rigidité relative à chaque structure. Cette découverte, associée à l'évidence d'un faible taux d'interconversion, nous fit douter de l'appartenance de ces formes à une quelconque catégorie hégélienne, la structure quaternaire en l'occurrence.

KLOTZ (1975) rappelle que la structure quaternaire se réfère à des systèmes macromoléculaires constitués de sous-unités liées par des liaisons non-covalentes et que la présence de ponts disulfures intercaténaires, comme il en existe dans la structure des immunoglobulines ou de l'insuline, ne sort pas du domaine de la structure tertiaire. A l'heure actuelle, nombre d'auteurs adoptent des positions moins dogmatiques et, notamment à propos des Immunoglobulines G, formulent le concept de structure quaternaire covalente (DEARS, 1977a et 1977b). Il ne nous semble donc pas incorrect de considérer les formes multiples de la Butyrylcholinestérase comme les différents moments d'une structure quaternaire covalente.

Cependant, la complexité structurale de cette enzyme est encore plus grande; elle nous apparut de façon plus nette après avoir relié les paramètres moléculaires aux paramètres géométriques et construit un modèle géométrique rendant compte des propriétés hydrodynamiques et permettant d'imaginer l'arrangement spatial des sous-unités entre elles. Bien que ce modèle ne soit qu'une silhouette grossière et relativement rigide, sa portée épistémologique fut grande et stimulante pour concevoir de nouvelles expériences, ainsi que pour imaginer la position des centres actifs par rapport aux zones de contact et préciser le rôle de certains résidus dans l'édification et la stabilisation de chaque enzyme. Car il apparaît que l'édification de cette structure quaternaire doit obéir à un processus beaucoup plus complexe que la simple oligomérisation par association de monomères. L'acide N-acétylneuraminique joue, en particulier, un rôle essentiel peut-être en relation avec une pièce de jonction de nature phospholipidique mise en évidence, de façon indirecte, par l'action des phospholipases et qui pourrait être située au niveau des interfaces.

Le plan de notre travail suit d'assez près la chronologie des événements, mais il s'en éloigne cependant parfois par le souci que nous avons eu de marquer une certaine continuité et une logique dans la progression et l'articulation des chapitres alors que, dans la pratique, il

nous est arrivé de progresser par bonds.

Notre travail comporte quatre grandes parties.

La première est consacrée au travail bibliographique. Nous l'avons voulue volontairement étendue, afin de tenter d'appréhender l'enzyme dans sa totalité. Le premier volet s'ouvre sur la biologie et la physiopathologie, le second se rapporte aux propriétés physicochimiques et catalytiques et le troisième, le plus important, a rapport aux problèmes de l'hétérogénéité des protéines et, en particulier, de notre enzyme.

La seconde partie est constituée par l'exposé de la méthodologie. Nous avons essayé d'ordonner ses différents chapitres selon un ordre logique partant de la mesure de l'activité, puis traitant des techniques de mise en évidence de l'hétérogénéité moléculaire, de mesure des paramètres moléculaires et fonctionnels, ainsi que des théories nous ayant permis de formuler notre modèle à partir des données recueillies à l'aide des techniques précédentes. Puis une méthodologie a été mise au point et appliquée à la recherche des facteurs de stabilisation des structures identifiées : elle fait appel à l'analyse des modifications physiques, chimiques et enzymatiques provoquées par divers agents sur les formes isolées préalablement ou sur le sérum actif.

Les résultats constituant la troisième partie sont présentés de façon enchaînée, en respectant autant que possible la logique et la progression de notre compréhension de la structure de l'enzyme.

Enfin, la dernière partie de ce travail est consacrée à la discussion de nos résultats que nous confrontons avec les données de la littérature, en essayant de dégager ou d'entrevoir la structure réelle de l'enzyme qui, malgré notre contribution, reste encore partiellement prisonnière de sa gangue.

TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

GENERALITES ET BIOLOGIE DE LA BUTYRYLCHOLINESTERASE DU SERUM HUMAIN

1. LES ESTERASES DU SERUM.

La Butyrylcholinestérase du sérum humain et, d'une manière plus générale, toutes les cholinestérases appartiennent à la classe 3 des hydrolases, sous-classe 1 des estérases. La principale caractéristique de ces enzymes est de catalyser l'attaque hydrolytique d'un substrat, un ester, par l'eau qui est, en fait, le cosubstrat.



1.1. Classification des estérases du sérum.

AUGUSTINSSON (1958) a établi une classification des estérases en trois groupes, sur la base de leurs propriétés électrophorétiques, catalytiques et de leur sensibilité à l'ésérine et aux organophosphorés.

- Les estérases A (Arylestérases : E.C.3.1.1.2)

Elles catalysent, de façon spécifique, l'hydrolyse des esters aromatiques tels que l'acétate de phényle ou de naphthyle. Normalement, elles n'attaquent pas les esters aliphatiques. AUGUSTINSSON (1962) a montré que la présence d'un groupe C=C directement lié à l'oxygène alcoolique est la condition nécessaire de l'hydrolyse enzy-

matique. Elles résistent à l'ésérine et à certains organophosphorés (AUGUSTINSSON, 1959).

Leur mobilité électrophorétique élevée les fait migrer au niveau de l'albumine.

- Les estérases B (Estérases aliphatiques, lipases, carboxylestérases : E.C.3.1.1.1.)

Leur activité estérasique s'exerce aussi bien sur les esters aromatiques qu'aliphatiques et l'on distingue des acétyl-propionyl-et butyryl-B estérases. Cependant, les esters de la choline ne sont pas hydrolysés.

Sensibles aux organophosphorés, elles résistent à l'ésérine 10^{-5} M.

Leur mobilité électrophorétique est plus faible que celle des estérases A et proche des α_1 -globulines.

- Les estérases C (Cholinestérases : E.C.3.1.1.8)

Elles hydrolysent rapidement les esters de la choline alors que les autres esters le sont plus lentement. Elles sont totalement inhibées par les organophosphorés et par l'ésérine à 10^{-5} M.

Leur mobilité électrophorétique faible les place entre les α_2 et les β -globulines.

1.2. Limites de la classification d'AUGUSTINSSON.

Il est nécessaire de faire remarquer que la mobilité électrophorétique des estérases, telle qu'AUGUSTINSSON l'a définie, n'a de signification que dans les conditions expérimentales dans lesquelles il opérait (colonne de cellulose et tampon véronal, pH 8,4, de force ionique 0,1).

Sur gel d'amidon, DUBBS (1960) a montré que la cholinestérase du sérum humain se présente comme un doublet dans la zone des $\alpha\beta$ tandis que les estérases A se répartissent sur quatre zones : un doublet qui coïncide avec la cholinestérase et dont les propriétés cor-

respondent à cette enzyme, une troisième zone, située entre les β et les α_2 globulines, et enfin une quatrième zone pâle et diffuse légèrement en avant de l'albumine et qui correspond aux estérases-A d'AUGUSTINSSON.

Dans des conditions voisines de celles d'AUGUSTINSSON, mais en utilisant des colonnes plus longues et un tampon de force ionique $\mu = 0,02$, WILDE et KEKWICK (1962) ont montré que la principale activité arylestérasique est constituée de trois enzymes qui migrent au niveau de la préalbumine. Cette zone est suivie d'un petit pic associé à l'albumine et d'un autre situé au niveau de la zone cholinestérasique.

Des techniques de séparation plus efficaces, alliées à des techniques histochimiques de révélation plus spécifiques, allaient contribuer à faire progresser nos connaissances sur les estérases sériques, permettre la découverte des formes multiples de la Butyrylcholinestérase, et conduire à la conclusion que, dans le sérum humain, il n'existe que des estérases de type A et la butyrylcholinestérase.

1.3. Relation de la Butyrylcholinestérase avec les autres estérases sériques.

La butyrylcholinestérase est probablement reliée phylogénétiquement aux autres estérases du sérum. AUGUSTINSSON (1973) a suggéré que cette enzyme et les carboxylestérases des vertébrés ont évolué à partir d'un ancêtre commun, dont le site actif possédait une sérine.

Une telle estérase primitive, qui apparaît comme un stade d'évolution intermédiaire, a d'ailleurs été détectée dans le plasma de certains reptiles. Cette enzyme, qui est une propionylestérase possède les propriétés des cholinestérases et des carboxylestérases. La butyrylcholinestérase est donc considérée, de ce point de vue, comme une carboxylestérase spécialisée, dont le site actif est adapté à la fixation, principalement par des forces de VAN DER WAALS de la zone cationique du substrat. L'évolution s'est donc traduite par l'acquisition d'un site anionique.

La zone estérasique du centre actif comporte une séquence d'acides aminés caractéristique, responsable de la spécificité des cholinestérases et des carboxylestérases comprenant une sérine active et un imidazole adjacent (BRESTKIN & ROZENGART (1965). Cette notion sera développée dans un prochain chapitre.

Pour ce qui concerne la relation de la butyrylcholinestérase avec les arylestérases, il convient de souligner qu'outre la relative insensibilité de ces dernières aux organophosphorés, on sait (ALDRIDGE, 1953) qu'elles sont capables d'hydrolyser le paraoxon. Des travaux récents (MENDOZA, 1976) suggèrent qu'elles pourraient jouer un rôle important dans la résistance à l'intoxication par certains organophosphorés précisément en hydrolysant ces composés avant qu'ils aient pu inhiber les cholinestérases.

2. NOMENCLATURE ET CLASSIFICATION DES CHOLINESTERASES.

La spécificité des cholinestérases s'exerce vis-à-vis des esters de la choline et l'on distingue essentiellement deux groupes d'enzymes.

2.1. Les acétylcholinestérases (AChE) : E.C.3.1.1.7.

Chez les mammifères, les acétylcholinestérases sont essentiellement localisées dans les membranes érythrocytaires et dans le système nerveux au niveau de la plaque motrice neuromusculaire et de la synapse neuroneuroneurique. Chez les autres animaux, on retrouve une distribution analogue, mais il convient de mentionner l'exceptionnelle richesse en AChE du venin de cobra et de l'organe électrique de certains poissons marins, *Electrophorus electricus* et *Torpedo marmorata*, qui constituent la principale source d'enzyme.

L'acétylcholine, substrat naturel, est un inhibiteur réversible aux fortes concentrations. Ces enzymes sont fortement inhibées par les ammoniums quaternaires, mais sont peu sensibles au diisopropylfluorophosphate (DFP).

Les AChE bactériennes, telle que celle de *Pseudomonas fluo-*

rescens inhibées par l'ésérine, mais non par le DFP, suscitent actuellement un grand intérêt (TANI et al. 1975).

2.2. Les Pseudocholinestérases ou Butyrylcholinestérases. (Ψ ChE, BuChE) : E.C.3.1.1.8.

On les rencontre essentiellement dans le sérum, le foie, le coeur et le pancréas; elles sont, en fait, présentes dans pratiquement tous les tissus, y compris certaines formations du système nerveux.

Leurs propriétés catalytiques, voisines de celles des AChE, peuvent varier sensiblement d'une espèce à l'autre chez les mammifères. Mais, lorsqu'on descend dans l'échelle du monde animal, on observe, en plus, des différences au niveau de la spécificité du substrat qui rendent parfois difficile la transposition des résultats.

Leurs substrats spécifiques sont la butyrylcholine et la propionylcholine. Non inhibées par un excès de substrat, elles le sont un peu par les ammoniums quaternaires et fortement par les organophosphorés tel que le DFP.

3. NATURE CHIMIQUE DES BUTYRYLCHOLINESTERASES

Dès 1954, SURGENOR et ELLIS avaient suggéré que la Cholinestérase du sérum devait être une glycoprotéine. On sait, à l'heure actuelle, que les BuChE se rattachent à cette classe de protéine et que la partie glucidique, riche en acide N-acétylneuraminique, occupe une place relativement importante dans la molécule.

Après électrophorèse préparative d'un matériel déjà enrichi en BuChE du sérum de cheval, HEILBRONN (1962) a montré que cette enzyme contient 3,2 % d'acide sialique.

3.1. Analyse centésimale de la copule glucidique.

Les travaux de HAUPT et al. (1966) sur le sérum humain ont

été plus avant dans l'analyse. Pour une enzyme dont la masse moléculaire est estimée à 348000, l'analyse chimique a fourni un pourcentage de sucres totaux de 23,9 %. Ces sucres se répartissent de la façon suivante :

- Hexoses : 9,3 % (rapport Galactose/Mannose = 1)
- Acétylhexosamines : 8,4 %
- Acide N-acétylneuraminique : 6,0 %
- Fucose : 0,2 %

Von UHLENBRUCK et al. (1977) viennent d'entreprendre l'étude de la séquence des chaînes saccharidiques à l'aide de lectines combinées à l'action de la neuraminidase. Leurs premiers résultats démontrent l'existence d'au moins trois type de chaînes.

Pour la BuChE du sérum de cheval, MAIN et al. (1974) estiment que la partie glucidique représente 17,4 % de la masse de l'enzyme et comprend :

- Hexoses : 5,40 %
- Glucosamine : 8,75 %
- Acide N-acétylneuraminique : 3,23 %

Les résultats de TENG et al. (1976), assez voisins, apportent une précision sur la répartition des hexoses. Les 20 % de sucres sont constitués de :

- | | | |
|---------------------------------------|---|---------|
| - Mannose : 6,59 % | } | 10,09 % |
| - Galactose : 3,50 % | | |
| - N-acétylglucosamine : 6,19 % | | |
| - Acide N-acétylneuraminique : 3,72 % | | |

3.2. Analyse centésimale de la partie protéique.

Si aucune séquence n'est connue, la composition en aminoacides de l'enzyme de la glande parotide de porc a été déterminée en 1969 par TUCCI & SEIFTER, après hydrolyse acide de l'enzyme purifiée et chromatographie sur échangeurs d'ions des aminoacides libérés. MAIN & al. (1974) ont également établi celle de la BuChE du sérum de cheval en attribuant à l'enzyme une masse moléculaire de 101000 par

site actif. TENG et al. (1976) ont obtenu des valeurs pratiquement identiques avec la même enzyme, en attribuant une masse moléculaire de 80000 au monomère. Enfin, récemment, MUENSH et al. (1976) ont publié celle de la forme tétramérique de l'enzyme du sérum humain à laquelle ils assument une masse moléculaire de 345000 et un pourcentage de glucides de 24,5 %.

Nous avons regroupé l'ensemble de ces résultats dans le tableau de la page suivante. La composition centésimale de la copule glucidique de l'enzyme de la glande parotide de porc et de la BuChE du sérum humain n'ayant pas été déterminée par les auteurs, nous avons été amené à recalculer, pour les deux autres enzymes, le nombre de résidus d'un aminoacide pour 100 résidus aminoacides, afin de pouvoir comparer facilement les compositions en aminoacides des trois enzymes. Dans leur ensemble, les compositions diffèrent assez peu; Cependant, on observe surtout avec les aminoacides hydrophobes quelques écarts significatifs.

4. ORIGINE DE LA CHOLINESTERASE PLASMATIQUE.

Chez l'homme, comme la majorité des glycoprotéines du plasma, la BuChE est synthétisée dans les hépatocytes. Par contre, chez certains animaux, l'enzyme sérique pourrait également avoir une origine intestinale ou pancréatique.

L'étude électrophorétique de l'enzyme hépatique humaine a révélé à SVENSMARK (1963) l'existence de trois formes de mobilité différente : l'une est identique à l'enzyme majoritaire du sérum, les deux autres sont déficitaires en acide sialique et l'auteur a suggéré qu'elles pourraient être des précurseurs de l'enzyme circulante. Cette hypothèse semble d'autant plus acceptable que la biosynthèse des glycoprotéines s'effectue en plusieurs étapes. La chaîne polypeptidique synthétisée sur les ribosomes de l'ergastoplasme est transférée, dans une seconde phase, dans le réticulum endoplasmique où elle est glycosylée. L'acide N-acétylneuraminique est incorporé en dernier dans l'appareil de GOLGI.

COMPOSITION DE TROIS BUTYRYLCHOLINESTERASES

Aminoacides	Mélange paratide de porc (1)		Sérum de cheval (2)			Sérum de cheval (3)			Sérum humain (4)	
	N/100 (*)	Résidus/ 368000	N/100 (*)	N/100 (**)	Résidus/ 101000	N/100 (*)	N/100 (**)	Résidus/ 80000	N/100 (*)	Résidus/ 345000
Asp	11,5	340	10,67	9,52	39	11,1	9,7	63±1	9,59	222
Thr	5,3	156	6,71	5,99	24	5,6	4,9	32±1	5,11	119
Ser	8,9	263	7,07	6,31	26	6,2	5,4	35±3	6,67	155
Glu	11,4	337	10,67	9,52	39	11,3	9,9	64±5	9,60	223
Pro	7,6	225	5,33	4,76	19	6,4	5,6	36±1	4,47	104
Gly	10,5	310	7,51	6,70	27	7,4	6,5	42±1	10,05	233
Ala	10,1	298	5,93	5,29	22	5,6	4,9	32±1	7,64	177
Cys	0,9	27	1,62	1,45	6	1,0	0,9	6±1	1,37	32
Val	4,0	118	5,83	5,20	21	5,5	4,8	31±1	4,84	112
Met	1,0	30	1,77	1,58	6	1,7	1,5	10±1	1,09	25
Ile	2,3	68	3,69	3,29	13	3,7	3,2	21±1	3,93	91
Leu	7,6	224	8,54	7,62	31	9,2	8,0	52±3	7,40	172
Tyr	2,1	62	3,37	3,01	12	3,5	3,1	20±2	5,11	119
Phé	5,1	150	5,53	4,93	20	6,3	5,6	36±2	4,75	110
Lys	5,3	156	6,40	5,71	24	6,0	5,2	34±1	7,76	180
His	1,9	56	1,52	1,36	6	0,9	0,8	5±1	1,82	42
Arg	4,4	130	5,09	4,54	19	5,3	4,6	39±1	5,36	125
Trp	-	-	2,67	2,38	10	2,6	2,3	15±1	3,38	78
Glucosamine				5,38	22		3,7	24±5		
Hexoses				4,08	17		7,5	49±7		
NANA				1,36	6		1,7	11±2		

* nombre de résidus/100 résidus aminoacides.

** nombre de résidus/100 résidus aminoacides + sucres.

(1) TUCCI & SEIFTER (1969)

(2) MAIN et al. (1974)

(3) TENG et al. (1976)

(4) MUENSH et al. (1976)

5. LES AUTRES BUTYRYLCHOLINESTERASES DE L'ORGANISME.

La présence de la BuChE n'est pas limitée au sérum et au foie. Des techniques histochimiques très fines, alliées à l'utilisation d'inhibiteurs, ont permis de la mettre en évidence chez l'homme, ainsi que chez les autres animaux, dans de nombreux organes ou tissus. KARCZMAR (1970, pp.62-74) et SILVER (1974, pp.427-440) ont passé en revue les différentes localisations de cette enzyme très ubiquitaire.

Si, chez l'homme et le cheval, la BuChE est seule présente dans le sérum, chez certaines espèces, AChE et BuChE coexistent (AUGUSTINSSON, 1958); chez les oiseaux et les poissons, c'est l'AChE qui est prédominante et, enfin, aucune des deux enzymes n'est présente dans le sérum des bovidés (ENGELHARD et al. 1967).

5.1. Milieu intérieur.

Outre le sérum, on trouve la BuChE dans presque tous les liquides biologiques : la lymphe, le liquide céphalo-rachidien, le colostrum, le lait, la bile et la salive.

5.2. Tissus.

5.2.1. Système nerveux

Dans le système nerveux central, la BuChE est présente en quantité appréciable chez l'homme et chez les autres mammifères, surtout dans la substance blanche sous-corticale où elle est en quantité supérieure à l'AChE. Elle est également localisée dans les cellules gliales et dans quelques neurones. Enfin, on la trouve associée à l'AChE dans les synapses, dans les ganglions du système nerveux autonome et au niveau des nerfs périphériques dans les cellules de SCHWANN.

Selon la théorie phylogénétique de BULLOCK & NACHMANSOHN (1942), établie sur des données embryologiques et histochimiques, l'apparition des ChE coïncide, dans l'ontogénèse avec la formation du système nerveux. Parallèlement, le développement du système nerveux s'accompagne d'une augmentation du nombre de formes multiples (TOMOVA, 1973). Cette théorie apparaît cependant de plus en plus contestable

depuis la découverte des ChE bactériennes, la mise en évidence chez certains végétaux d'enzymes dont les propriétés sont voisines des BuChE et, surtout, depuis que la reprise des travaux de BULLOCK & NACHMANSOHN a abouti à la preuve de l'existence de ChE chez certains protozoaires, alors que leur théorie était en partie fondée sur l'absence de cette enzyme chez les animaux les plus inférieurs.

5.2.2. Autres tissus.

La BuChE est présente dans le système cardiovasculaire au niveau du myocarde, dans l'endothélium et les muscles lisses des capillaires, dans certaines cellules des muscles bronchiaux et des glandes à mucus. On la trouve encore dans le tube digestif et ses organes associés, dans les glandes salivaires, les cellules épithéliales du tractus intestinal et le pancréas où elle existe en grande quantité chez le chien et le porc. Son intense activité rénale lui a fait attribuer un rôle dans la perméabilité cellulaire. Enfin, divers systèmes glandulaires présentent une activité butyrylcholinestérasiqye : la thyroïde, les parathyroïdes, les glandes surrénales, l'hypophyse, les cellules épithéliales de la prostate et les gonades.

6. IMPLICATION DE LA CHOLINESTERASE SÉRIQUE EN PHYSIOPATHOLOGIE ET EN TOXICOLOGIE.

6.1. Le taux normal plasmatique.

La BuChE est présente dans le plasma à une très faible concentration. Selon SURGENOR & ELLIS (1954), celle-ci serait de l'ordre de 7 mg/l. HAUPT et al. (1966), par une méthode immunochimique ont obtenu une valeur de 9 mg/l.

Actuellement, son activité est le plus souvent déterminée à l'aide de techniques colorimétriques dérivées de la méthode d'ELLMAN et al. (1961), basée sur l'emploi d'un ester de la thiocholine comme substrat: le produit d'hydrolyse, la thiocholine, réduit un composé chromogène, l'acide 5:5-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) (DTNB) libérant l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque de coloration jaune.

Il serait vain de rappeler les diverses modalités d'application de la méthode d'ELLMAN, d'autant qu'AUGUSTINSSON, dans sa revue exhaustive de 1971, en recense une vingtaine.

A titre d'exemple, nous indiquons dans le tableau ci-dessous, les caractéristiques de quelques unes des techniques les plus usuelles, avec les taux plasmatiques normaux qu'elles fournissent.

TECHNIQUE	TAMPON	SUBSTRAT	TEMPERATURES	VALEURS (mU/ml)
GARRY & ROUTH (1965)	TRIS 0,2 M/HCl $\mu = 0,153$ pH = 7,40	BuSch : $2 \cdot 10^{-3}$ M	37°C	:2600-5500 :1900-4600
SIDERS et al. (1968)	TRIS $\mu = 0,153$ pH = 7,40	Propionyl- thiocholine (PFIZER)	37°C	2800-6600
KNEDEL et al. (1967)	Phosphate 0,02M pH = 7,7	BuSch : $5,7 \cdot 10^{-3}$ M (MERCK, 1974)	25°C	3000-8000
ELLMAN et al. (1961)	Phosphate 0,05M pH = 7,2	ASch : $5 \cdot 10^{-3}$ M (BOEHRINGER- MANNHEIM)	25°C	1900-3800
KNEDEL et al. (1967)	Phosphate 0,05M pH = 7,7	BuSch : $7 \cdot 10^{-3}$ M (BOEHRINGER- MANNHEIM)	25°C	3000-9300

6.2. Variations physiologiques.

Le taux de butyrylcholinestérase évoluant dans des limites très larges, les variations physiologiques sont difficiles à enregistrer et les résultats souvent contradictoires d'un auteur à l'autre. Il semble cependant que l'activité normale soit soumise à l'influence de divers facteurs.

On observe l'existence d'un rythme circadien passant par un maximum vers midi et un minimum vers minuit ainsi que des variations saisonnières. Des différences en fonction de l'âge, du sexe et de la

race ont également été montrées.

Actuellement, on admet que l'activité chez l'homme est plus intense que chez la femme, qu'elle augmente légèrement au cours de la vie mais, qu'au delà de 60 ans, les différences intersexuelles disparaissent (SIDELL & KAMINSKIS, 1975). Cette observation constitue un argument en faveur de l'hypothèse d'un contrôle ou d'une dépendance hormonale du taux de cholinestérase circulant. Cette hypothèse semble d'autant plus juste que ces auteurs ont montré que les contraceptifs oraux abaissent, de façon significative l'activité cholinestérasique chez la femme et que l'on sait, par ailleurs, que cette activité est également diminuée lors de la grossesse.

Les hormones sexuelles femelles pourraient donc exercer une action dépressive au niveau de la synthèse hépatique de l'enzyme et au niveau de sa sécrétion. Cette action semble cependant en contradiction avec l'augmentation de la biosynthèse des glycoprotéines que l'on enregistre sous l'effet des oestroprogestatifs.

Récemment, VERJEE et al. (1977) ont mis en évidence une dépression de l'activité de l'enzyme sérique après administration de glucocorticoïdes. D'autre part, l'injection de cortisol à des rats, en inhibant l'activité pseudocholinestérasique du foie, suggère que ces hormones peuvent exercer, sur la biosynthèse de l'enzyme, une action inhibitrice. Mais ces résultats et l'hypothèse qu'ils impliquent sont en contradiction avec les effets généraux des glucocorticoïdes sur la cellule hépatique, allant dans le sens d'une stimulation de la synthèse des RNA et des protéines.

En dehors des hormones stéroïdes, les hormones thyroïdiennes semblent également exercer un contrôle analogue (LEEWIN, 1966).

Il est donc possible que la biosynthèse ou la sécrétion de l'enzyme soit soumise à une régulation multihormonale.

6.3. Variations pathologiques .

La cholinestérase se trouve impliquée dans un certain nombre de processus pathologiques. Les variations d'activité qui en résultent sont connues depuis longtemps, mais leur valeur diagnostic est considérée comme assez faible, étant donnée la dispersion des valeurs normales.

6.3.1. Affections hépatiques.

Produite par le foie, la BuChE apparaît pour nombre d'auteurs comme un bon indicateur des fonctions hépatiques (TERZANI et al. 1968). L'étude de SIDERS et al. (1968) montre une diminution de l'activité dans les hépatites, les cirrhoses et les cancers avec métastases hépatiques. Cependant, KUROSE (1971) a montré qu'il n'y a pas de corrélation significative entre la dépression d'activité et le degré de l'atteinte hépatique. Tout au plus, peut-on suspecter une affection maligne lorsque la diminution de l'activité cholinestérasique est conjointe à une augmentation de la LDH (STRAUB, 1975).

6.3.2. Affections rénales.

Dans les divers syndrômes néphrotiques, on observe une augmentation de l'activité. Elle a été observée, en particulier, dès 1958, par VINCENT, dans la néphrose lipoïdique. Cette augmentation peut être interprétée comme le reflet de la stimulation de la synthèse protéique hépatique, en réponse à la fuite rénale (SZASZ et al. 1964). Chez l'enfant, dans la néphrose lipoïdique, WAY et al. (1975) ont corrélié l'augmentation de l'activité avec celle des LDL (Low density lipoproteins).

6.3.3. Affections néoplasiques.

LOISELET et al. (1968) ont étudié les variations d'activité de la BuChE chez des malades atteints de cancer, mais les cliniciens ne semblent pas avoir retenu la valeur diagnostic de la BuChE dans ces affections (SCHWARTZ, 1973).

6.3.4. Affections cutanées.

TROTTER & FAIRBURN (1966) ont observé une baisse d'activité chez les patients souffrant d'eczéma. A l'opposé, l'activité est augmentée dans le vitéligo (DIMOV et al. 1976).

6.3.5. Maladies infectieuses.

Le typhus (BORISOVA, 1966) et la tuberculose rénale (AKOPYAN et al. 1976) causent une diminution de l'activité qui peut atteindre 85 % dans le deuxième cas.

6.3.6. Troubles hormonaux.

Une augmentation de l'activité apparaît dans le diabète (KUROSE, 1971) ainsi que dans l'hyperthyroïdie. Corrélativement, une diminution est enregistrée dans l'hypothyroïdisme (THOMPSON & WHITTAKER, 1965).

6.3.7. Maladies d'origine génétique.

Les variations de l'activité de la BuChE sérique peuvent être d'origine génétique. Un premier type correspond à l'existence de variants génétiques de l'enzyme. Un second concerne l'association d'une modification de la biosynthèse ou de l'activité avec un autre trouble génétique.

Le problème des variants sera abordé au chapitre de l'hétérogénéité génétique de la BuChE, mais leur intérêt clinique est grand puisque plusieurs de ceux-ci sont impliqués dans la réponse exagérée à la succinylcholine (Suxamethonium) utilisée comme myorelaxant en anesthésiologie et, normalement, hydrolysée par la BuChE dans un temps assez court. Les sujets porteurs de ces gènes ont une activité cholinestérasique inférieure à la normale et les individus homozygotes, les plus sensibles à la succinylcholine, présentent le risque de faire une apnée à la suite de l'injection (EVANS et al. 1953). L'apnée au Suxamethonium peut également survenir chez des individus normaux, mais dont l'enzyme est inhibée (cas des sujets cancéreux traités par la cyclophosphamide et dont l'état nécessite une intervention chirurgicale) (MONE & MATHIE, 1967).

LA MOTTA & WORONICK (1971) rapportent que GALLENGO & ARENDS, en 1969, ont constaté que la fréquence du variant C_5^+ était anormalement élevée chez les individus atteints de myélome multiple.

Enfin, récemment, WHITTAKER & SPENCER (1977) ont remarqué, chez les individus atteints de psychose maniaco-dépressive, que la fréquence des hétérozygotes $E_1^U E_1^f$ (résistants au fluorure et sensibles au Suxamethonium) était élevée. La nature exacte de cette relation est inconnue, mais les auteurs pensent que cette observation sera peut-être le point de départ de la découverte du rôle biologique de la cholinestérase.

6.3.8. Intoxications par les organophosphorés.

L'emploi des insecticides organophosphorés en agriculture est souvent la cause d'intoxications très graves. Elles surviennent lors d'erreurs de manipulation ou chez des sujets exposés en permanence. Ainsi, 25 % des travailleurs de Ceylan manipulant ces insecticides ont un niveau de cholinestérase à 50 % de la normale (SENTHESANMUGANATHAN & RAKARATNAM, 1975).

Classiquement, il est admis qu'une chute de 40 % de l'activité est un signe d'alarme et qu'au delà de 50 à 60 %, il faut écarter le sujet (FREJAVILLE et al. 1971). Une récente enquête statistique indienne, portant sur 166 travailleurs exposés aux organophosphorés, vient confirmer cette règle. Lorsque 50 % de l'activité est inhibée, on n'observe aucun signe clinique. Entre 50 et 62,5 %, les signes cliniques apparaissent et, au delà de 75 %, le risque de mortalité est élevé (KASHYAP & GUPKA, 1976). Ces observations sont valables pour l'intoxication chronique.

Le dosage de l'activité cholinestérasique du sérum ou des érythrocytes ne présente que peu d'intérêt; par contre, dans le pronostic des intoxications aiguës, un taux très bas, voire nul, ne reflète aucunement la gravité de l'intoxication (SUCHEL & FAUVET, 1974).

La mesure de l'activité cholinestérasique ne doit donc être qu'un indicateur biologique de l'exposition aux pesticides (LONG, 1975).

Cependant, plusieurs tentatives ont cherché à corréler la gravité de l'intoxication avec l'activité de l'enzyme. Actuellement, il semble admis que le pourcentage de réactivation, in vitro, par les oximes, constitue le meilleur test pronostic (BOYADJIEV, 1974; ANDREINI et al. 1974).

7. ROLE BIOLOGIQUE .

Le rôle biologique de la BuChE demeure la question centrale que les chercheurs se posent depuis 1932, date de sa découverte dans le sérum par STEDMAN.

Actuellement, on reste encore au stade des hypothèses, parfois très audacieuses, et les "tartes à la crème" qui jalonnent l'histoire de la biochimie n'ont pas manqué d'atteindre les biochimistes qui se sont penchés sur ce sujet.

Même si l'on est parvenu à corréler ses variations d'activité avec les modifications de certains métabolismes, on ne peut qu'établir l'existence d'une liaison fonctionnelle assez lâche avec eux, mais le rôle biologique de l'enzyme reste inconnu.

Ces hypothèses que nous présentons mettent en cause non seulement l'enzyme plasmatique mais également certaines BuChE tissulaires; elles ont le mérite d'élargir le champ d'investigation et de présenter l'enzyme circulante comme un cas particulier mais fonctionnellement liée aux autres butyrylcholinestérases et peut-être aussi à l'acétylcholinestérase.

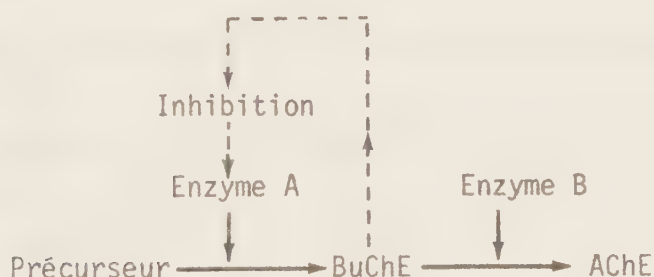
Le rôle biologique de l'AChE des jonctions neuromusculaires et des autres synapses cholinergiques dans la transmission de l'influx nerveux est bien connu depuis les travaux de NACHMANSOHN (SILVER, 1974, pp.303-354). Le rôle principal de cette enzyme est de catalyser l'hydrolyse de l'acétylcholine afin de limiter dans le temps l'effet du médiateur au niveau des récepteurs. Quant à l'AChE érythrocytaire de nombreuses hypothèses ont été émises mais ses fonctions demeurent obscures (HERZ & KAPLAN, 1973).

7.1. Relations possibles entre BuChE et AChE .

Pour la BuChE, la première hypothèse qui vient à l'esprit en regard de l'importance physiologique de l'AChE est l'existence de relations entre les deux enzymes.

- Certains auteurs ont pensé que la BuChE pouvait exercer un rôle protecteur de l'AChE contre les organophosphorés (LEHMANN et al., 1961) . L'association de l'AChE et de la BuChE à des membranes dans lesquelles s'effectuent des transports ioniques, de Na^+ en particulier, notamment au niveau de la barrière hémocéphalique, a poussé certains (SILVER, 1974, pp 355-388) à attribuer à la BuChE de la paroi des capillaires cérébraux un rôle dans le contrôle de la perméabilité de ces structures. Mais la présence de l'enzyme à ce niveau pourrait être aussi de constituer une barrière enzymatique contre une arrivée exogène d'acétylcholine.

- Récemment KOELLE et al. (1976, 1977 a, 1977 b) ont montré que la BuChE des ganglions du système nerveux autonome pourrait être un précurseur de l'AChE et que, par ses variations de concentrations, elle participerait à la biosynthèse de cette dernière en inhibant une des premières étapes.



7.2. Implication dans le métabolisme de l'acétylcholine.

D'autres équipes recherchent le rôle de la BuChE au niveau du métabolisme de l'acétylcholine.

- Ainsi selon FUNNEL & OLIVER (1965) la BuChE exercerait une action régulatrice homéostatique sur le rapport choline/acétylcholine plasmatique.

- Pour MEZINCESCO & GHETIE (1974) les tissus présentant une activité butyrylcholinestérasique synthétiseraient également de la butyrylcholine. La fonction de la BuChE serait de prévenir l'action nicotinique de cet ester en l'hydrolysant dès sa synthèse. La butyrylcholine serait synthétisée concurremment à l'acétylcholine sous l'influence de la choline acétyl transférase (E.C.2.3.1.6.). L'estérification de l'acétylCo A ou du butyrylCo A par la choline serait indifféremment rendue possible par la spécificité relativement large de l'enzyme. La résorption d'acide butyrique et de tributyrine administrés dans la ration alimentaire de souris favoriserait la synthèse hépatique de la butyrylcholine et influencerait l'activité de la BuChE. L'hypothèse de ces auteurs, certes séduisante, reste fragile car la présence de la BuCh dans les tissus est encore très contestée.

Pourtant, CLITHEROW et al. (1963) ont émis l'hypothèse que la BuCh se formerait à partir du butyrylCo A produit par le catabolisme des acides gras. Ces auteurs pensaient même que cet ester devait être rapidement détruit par la BuChE en raison de sa dangereuse potentialité nicotinique.

7.3. Butyrylcholinestérase et lipoprotéines plasmatiques.

Avec ces travaux apparaît une intéressante direction de recherches dans laquelle la BuChE interviendrait au niveau du métabolisme des lipides et en particulier des lipoprotéines.

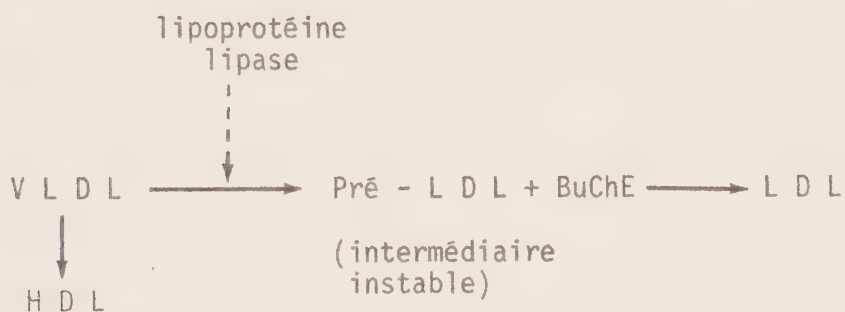
Les récentes données de KUTTY et al. (1977) tout en restant très partielles apportent de nouveaux éléments sur l'interaction entre la BuChE et les lipoprotéines du plasma. Des fractions de β -lipoprotéines isolées par précipitation avec un mélange d'héparine et de chlorure de calcium présentent une activité cholinestérasique proportionnelle à la concentration des lipoprotéines. D'autre part, si l'activité de la BuChE est augmentée dans la néphroselipotoïdique comme nous l'avons souligné, lors de l'intoxication au parathion la teneur en β -lipoprotéines du sérum diminue. Enfin le traitement de rats à la néostigmine pro-

voque une diminution du taux des β -lipoprotéines circulantes et une chute de l'incorporation de ^3H -lysine par ces protéines. Par contre, le marquage des α -lipoprotéines par ^3H -lysine s'accroît.

Sur la base de ces observations les auteurs proposent un schéma expliquant le mécanisme de formation des L D L (β -lipoprotéines) à partir des V L D L (pré β -lipoprotéines) en présence de BuChE.

Cette conversion passe par un intermédiaire instable, pré-L D L.

L'augmentation des H D L (α -lipoprotéines) corrélative à la chute des L D L lorsque la BuChE est inhibée suggère que l'enzyme joue un rôle très important dans la transformation des lipoprotéines circulantes. Selon KUTTY et al. (1977) l'enzyme interagirait au niveau des lipoprotéines intermédiaires et participerait à la formation de L D L.



CHAPITRE II

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET CATALYTIQUES

1. PROPRIETES MOLECULAIRES.

Les travaux les plus anciens faisaient apparaître la BuChE comme une protéine unique parfaitement définie (SURGENOR & ELLIS, 1954). Cependant, l'introduction et le développement de techniques électrophorétiques fines, sur gel d'amidon, puis sur gel de polyacrylamide, révélèrent, dès 1960 (DUBBS et al.) l'existence d'une hétérogénéité électrophorétique qui fut bientôt rapprochée des isoenzymes que MARKERT & MØLLER (1959) venaient récemment de découvrir.

Les études ultérieures devaient venir préciser cette notion et faire apparaître, à côté d'une hétérogénéité génétique déjà connue, l'existence d'un polymorphisme moléculaire et d'une hétérogénéité catalytique dont le déterminisme demeure toujours obscur.

Aussi, il semble incorrect de parler de propriétés moléculaires et catalytiques de la BuChE quand cette enzyme recouvre plusieurs espèces moléculaires distinctes. Ce problème ne peut être abordé que dans le cadre de l'étude des formes multiples. Et pourtant, la plupart des revues ou des ouvrages généraux se réfèrent encore aux propriétés de l'enzyme tétramérique, la forme la plus importante. La raison en est simple et technique. La majorité des auteurs a travaillé et travaille toujours sur des enzymes purifiées. Or, encore actuellement, les techniques de purification de l'enzyme sont longues, fastidieuses, non sélectives, d'un faible rendement et aboutissent, le plus souvent, à la perte des formes moléculaires mineures.

Nous ne traiterons donc, dans ce chapitre, que les propriétés moléculaires de l'enzyme purifiée donc, en principe, de l'enzyme tétramérique. Nous émettons cependant une réserve car, en raison d'une certaine réversibilité de l'état d'agrégation de l'enzyme, certaines des valeurs énoncées peuvent être, en réalité, la résultante de la somme des contributions individuelles des différentes formes.

2. PROPRIETES MOLECULAIRES DE L'ENZYME PURIFIEE.

2.1. Masse moléculaire et constante de sédimentation.

L'enzyme du sérum humain apparaît assez proche de celle du cheval avec une constante de sédimentation de l'ordre de 12 et une masse moléculaire légèrement supérieure à 300000.

AUTEURS	TECHNIQUE	S _{20,w}	M
ENZYME DU SERUM HUMAIN---			
SURGENOR & ELLIS (1954)	Ultracentrifuga- tion analytique.	12	300000
HAUPT & al. (1966)	Equilibre de sédimentation .	11,95	348000
DAS & LIDDELL (1970)	Ultracentrifuga- tion en gradient de saccharose .	12,44	367000
	Filtration sur gel.		365000
ENZYME DU SERUM DE CHEVAL :			
MAIN & al. (1972)	Filtration sur gel.		315000
LEE & HARPST (1973)	Equilibre de sédimentation. Diffusion de la lumière.	11,5	440000 ± 40000
			440000 ± 60000
MAIN & al. (1974)	Ultracentrifuga- tion analytique.	11,1	-
TENG & al. (1976)	Equilibre de sédimentation à grande vitesse .	-	317000 ± 12000

2.2. Rayon de Stokes .

Par filtration sur gel, DAS & LIDDELL (1970) estiment le R_S de l'enzyme humaine de l'ordre de 77 à 91 Å .

2.3. Volume spécifique partiel .

Les valeurs ne sont connues que pour la BuChE du sérum de cheval. LEE & HARPST (1973) l'ont trouvé égal à 0,78 ml/g par équilibre de sédimentation dans l'eau et dans l'eau lourde, alors que MAIN & al. (1974) ont obtenu 0,688 ml/g par densitométrie et 0,712 ml/g par le calcul théorique, connaissant la composition en sucres et en aminoacides de l'enzyme.

Récemment, TENG et l'équipe de LEE & HARPST (1976) ont déterminé le volume spécifique partiel de leur enzyme purifiée, par densitométrie et à partir de la composition centésimale de l'enzyme. Ils ont obtenu respectivement 0,723 ml/g et 0,710 ml/g.

2.4. Rapport de friction.

Selon LEE & HARPST (1973) avec un rapport de friction de 1,46, l'enzyme du sérum de cheval apparaît comme légèrement asymétrique et hydratée.

2.5. Viscosité intrinsèque.

Chez le cheval, la viscosité intrinsèque à 25°C est égale à 6,6 ml/g (LEE & HARPST, 1973). Or, les valeurs supérieures à 4-5 ml/g traduisent une déviation de la forme globulaire. La BuChE de sérum de cheval apparaît donc bien asymétrique. La valeur de 10 ml/g apportée par TENG & al. (1976) accentue encore ce caractère.

2.6. Mobilité électrophorétique et point isoélectrique.

Sur papier, l'enzyme du sérum humain à pH 8,6, entre 1 et 4°C, dans un tampon de force ionique de l'ordre de 0,08 à 0,10, a une

mobilité de $-3,1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$. Après traitement à la neuraminidase, la mobilité chute à $-0,2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ (SVENSMARK & KRISTENSEN, 1963) tandis que le pI passe de 2,9-3,0 à 6,7 - 7,0. Dans les mêmes conditions, la mobilité de l'enzyme du sérum de cheval est de $-2,9 \cdot 10^{-5}$ et son pI de 3,1. Après traitement à la neuraminidase, l'enzyme se révèle hétérogène avec des mobilités comprises entre 0,8 et $-1,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$, et des points isoélectriques distribués entre 3,6 et 5,2 (SVENSMARK & HEILBRONN, 1964).

Les valeurs de pI que SVENSMARK & KRISTENSEN avancent pour l'enzyme native sont les plus faibles de la littérature.

SVENSMARK (1965) dans une importante revue rapporte qu' AUGUSTINSSON, en 1944, a obtenu 4,36 comme valeur pour le pI de la BuChE du sérum humain. SURGENOR & ELLIS, en 1946, ont donné un chiffre plus élevé, entre 4,6 et 4,9, en étudiant la solubilité de l'enzyme dans des mélanges d'éthanol-eau. Cependant, en 1954, ces mêmes auteurs, par électrophorèse, ont retrouvé une valeur plus proche de celle d'AUGUSTINSSON, de l'ordre de 4,4. Chez le cheval, par électrophorèse en veine liquide, AUGUSTINSSON (1944) a obtenu 4,4, KRAUP & WERNER (1947) 5,2 et HEILBRONN (1962) 4,3.

Les résultats fournis plus récemment par les techniques d'électrofocalisation diffèrent assez peu des précédents. DAS & LIDDELL (1970) ont trouvé un pI de 3,99 et GAFFNEY (1970) de 4,2.

La disparité des résultats nous semble en partie liée aux conditions techniques (le pI est fonction de la force ionique) mais elle peut aussi résulter de modifications survenues lors de la purification.

2.7. Nombre de sites actifs.

Les données font encore défaut pour ce qui concerne la BuChE du sérum humain mais, pour l'enzyme de cheval, JANSZ & COHEN (1962) ont estimé à 84000 la masse moléculaire par site actif. En 1972, MAIN et al., par titrage au DFP, ont calculé que la masse mo-

lécule doit être de 143500 par site actif, ce qui représente deux sites par molécule. Mais, dans leur publication de 1974, avec une masse par site actif d'environ 101300, soit 30 % plus faible que la précédente, ces auteurs admettent que le nombre de sites actifs par molécule peut être supérieur à 2.

3. CONSTITUTION ET TOPOGRAPHIE DU CENTRE ACTIF DES CHOLINESTÉRASES.

3.1. Le centre actif des cholinestérases.

Les cholinestérases fonctionnent sans coenzyme et leur activité catalytique est liée à l'existence d'un centre actif que l'étude à l'aide d'analogues structuraux du substrat et d'inhibiteurs révèle constitué de deux sites dont la constitution est assez bien connue. Le schéma proposé par WILSON (1952) pour l'acétylcholinestérase reste admis et il est vraisemblable que la structure ou la configuration du centre actif de la butyrylcholinestérase doit être voisine (WILSON, 1954).

Le Centre de l'AChE est constitué de deux éléments :

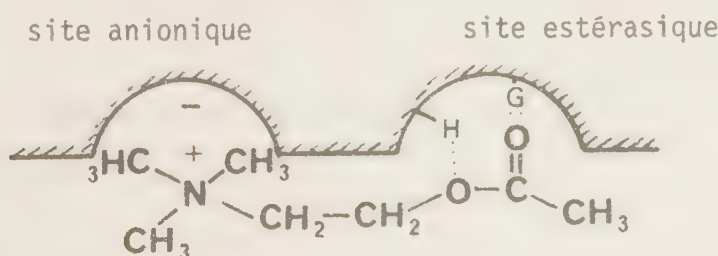
- un site estérasique lieu de la catalyse,
- un site anionique qui sert à orienter le substrat en fixant son ammonium quaternaire par des forces électrostatiques.

Ces deux sites sont séparés d'une distance d'environ 5,5 Å.

3.2. Constitution du centre actif de l'acétylcholinestérase.

3.2.1. La région située entre les sites.

La surface de cette région constituée de résidus apolaires contribue également à positionner le substrat en interagissant avec la chaîne aliphatique de la choline par des liaisons hydrophobes.



3.2.2. Le site anionique.

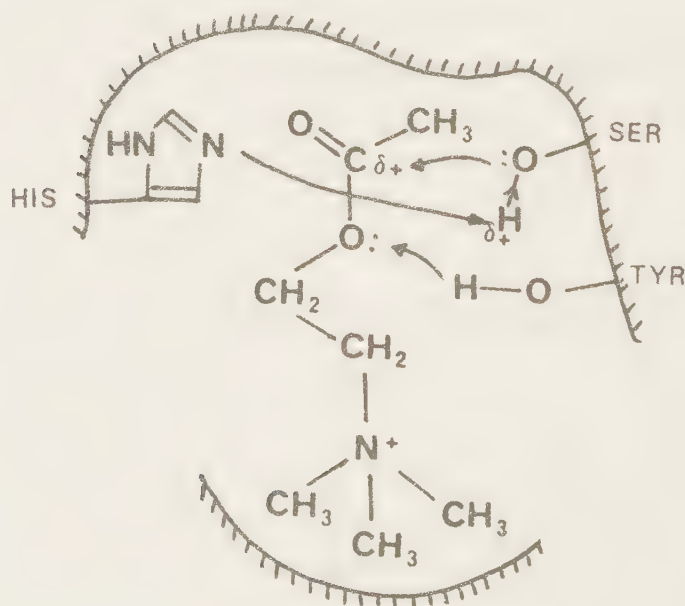
Il semble que les groupements ω -carboxyliques des aminoacides dicarboxyliques (aspartique et glutamique) soient la principale origine de sa charge négative. En plus, des résidus hydrocarbonés interagissent par liaisons hydrophobes avec les trois groupements méthyles.

3.2.3. Le site estérasique.

Parmi les aminoacides qui le constituent on en distingue trois qui participent à la fixation du substrat et à sa catalyse, ils déterminent :

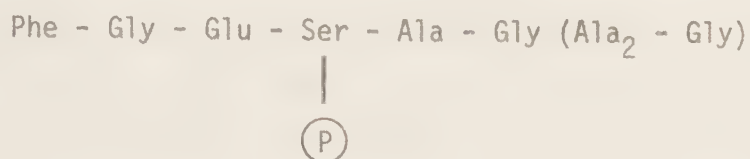
- un pôle nucléophile $\ddot{G}$, lieu de la catalyse et constitué du cycle imidazole d'une histidine et de la fonction alcool d'une sérine adjacente. Cette dernière apparaît comme le principal groupement fonctionnel des estérases.

- un pôle électrophile H , site de spécificité auxiliaire participant à l'orientation du substrat et formé de la fonction phénol d'une tyrosine.



JANSZ et al. (1959) ont pu apporter quelques indications concernant les aminoacides vicinaux de la sérine. L'enzyme du sérum

de cheval a été, dans un premier temps traitée au $DF^{32}P$, puis après dégradation partielle de l'enzyme, la séquence du peptide renfermant la radioactivité a été déterminée.



Une ambiguïté porte sur l'ordre des deux aminoacides entre parenthèses, mais cette séquence est semblable à celle que l'on retrouve chez d'autres enzymes dont la sérine est un des éléments du centre actif : acétylcholinestérase, aliestérase, chymotrypsine (KARCZMAR, 1970, p. 123). L'histidine et la tyrosine semblent être éloignées de la sérine dans la séquence de la chaîne polypeptidique.

3.3. Différences entre AChE et BuChE.

Les différences qui existent entre l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase ne doivent pas tant porter sur la structure du site catalytique que sur des différences dans les régions voisines et en particulier celles du site anionique.

3.3.1. Zones hydrophobes.

Au voisinage du centre actif, on distingue plusieurs zones hydrophobes d'étendues différentes.

- Dans la région du site anionique existent deux zones hydrophobes A_1 et A_2 (KABACHNIK, 1970). La zone A_1 semble jouer un rôle plus important chez la butyrylcholinestérase que chez l'acétylcholinestérase dans l'interaction avec les groupements méthyles du substrat.

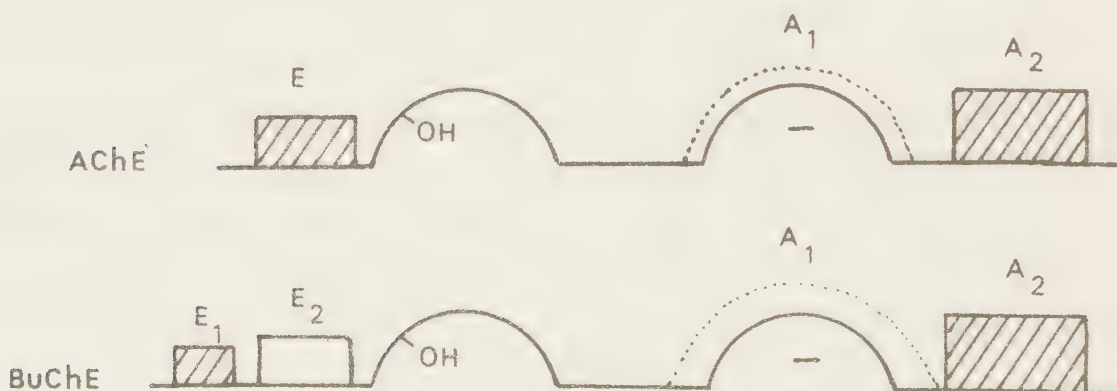
- Dans la région du site estérasique de la butyrylcholinestérase sont situées deux zones hydrophobes, E_1 et E_2 , correspondant à une chaîne à 7 carbones et séparées par un groupement hydrophile. AUGUSTINSSON dès 1966 avait d'ailleurs remarqué que les sites estéra-

siques semblaient présenter des différences.

3.2.2. Rôle des zones hydrophobes.

Le rôle de la zone A_2 et de ces deux dernières régions n'apparaît pas clairement mais il semble peu vraisemblable que ces zones se soient formées accidentellement au cours de l'évolution.

L'hypothèse suivante semble plus favorable. L'acétylcholine et les autres esters de la choline, sont des molécules hydrophiles et elles peuvent se fixer de façon non spécifique sur des groupements polaires autres que ceux du centre actif. Cette fixation, en quelque sorte parasite, diminue l'interaction du substrat avec le centre actif; les zones A_2 , E_1 et E_2 en interférant avec les régions hydrophiles provoquent l'expulsion des molécules d'acétylcholine et augmentent leur probabilité de rencontre avec le centre actif.



Les différences entre les deux enzymes apparaissent donc principalement liées à la nature, à l'étendue et à la proximité spatiale des zones hydrophobes du centre actif.

4. MECANISME DE L'HYDROLYSE .

L'équation générale d'hydrolyse des substrats esters ou thio-esters est la suivante :



R - C O - : acyle (acétyl, propionyl, butyryl, benzoyl ...)

R' X - : résidu alcool ou thiol (choline, thiocholine, naphtol).

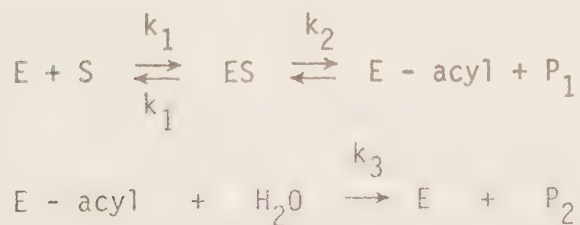
Ce sont WILSON et al. en 1950 qui proposèrent le premier schéma réactionnel : l'hydrolyse du substrat se déroule en plusieurs étapes que les techniques de cinétique rapide ont permis de définir par la mise en évidence des complexes intermédiaires, du calcul de leurs concentrations et de la détermination des constantes de vitesse.

Il est admis qu'il doit se produire simultanément une attaque nucléophile par les éléments du pôle nucléophile, et une attaque électrophile sur un doublet électronique de l'oxygène de la liaison ester entraînant la formation du complexe de Michaelis E S .

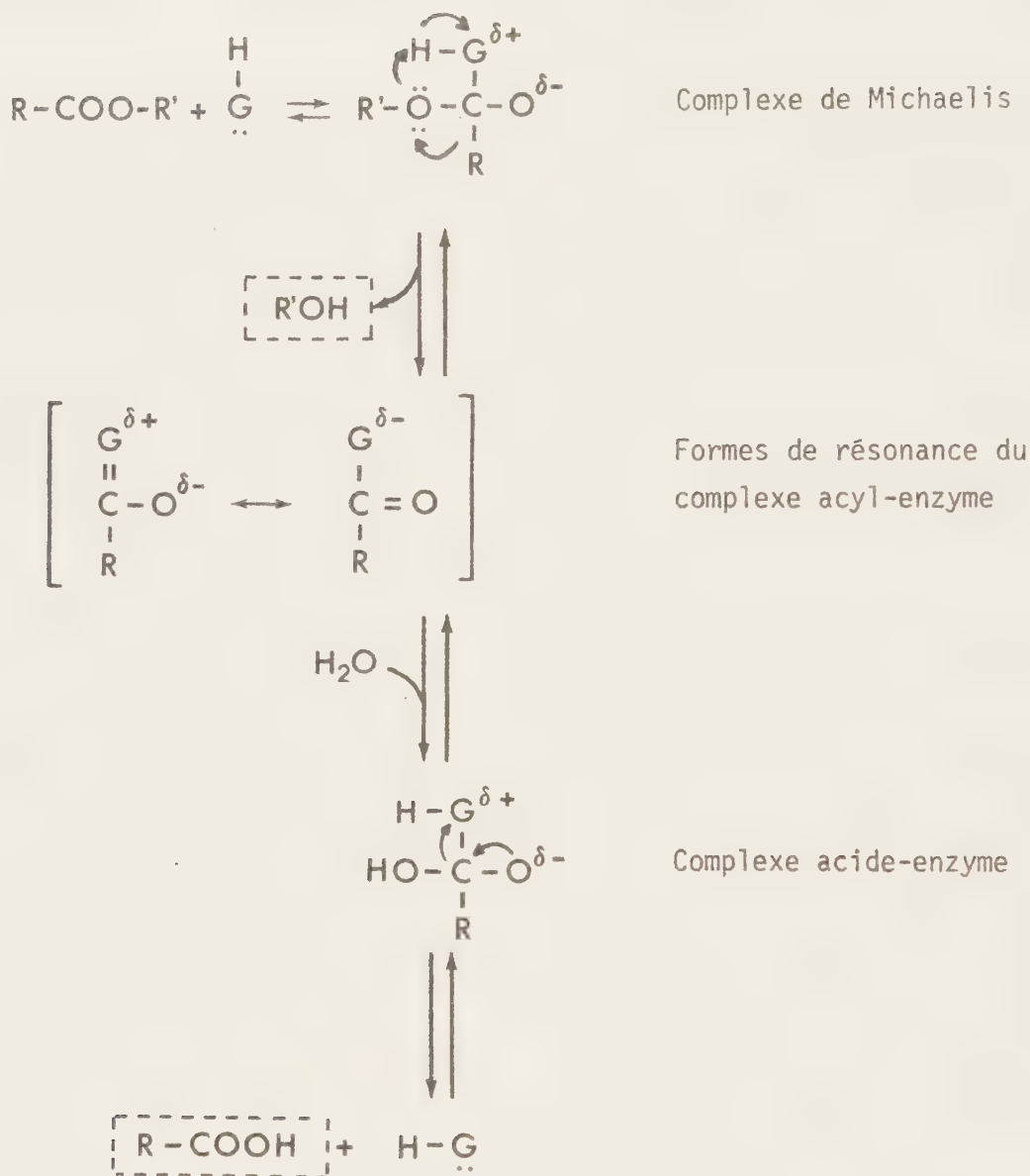
Ainsi au niveau du pôle nucléophile $\ddot{G}$ se forme une liaison covalente entre l'enzyme et le carbone du groupement carboxylique de l'acyle; tandis que l'oxygène, dans le cas de la choline, attaque l'hydrogène mobile de la tyrosine et l'arrache. Puis il y a rupture de la liaison ester et la choline quitte le centre actif. Le groupement acyle reste encore fixé à l'enzyme et donne un complexe existant sous deux formes de résonance. Cette acyl-enzyme très réactive fixe rapidement l'eau, cosubstrat nucléophile, pour engendrer un dernier complexe acide-enzyme de structure analogue au complexe initial ester-enzyme.

Ce complexe final se dissocie rapidement et libère l'acide.

soit :



Mécanisme général



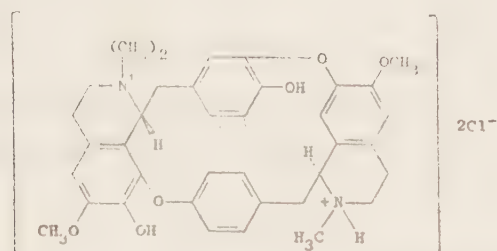
5. INHIBITEURS DE L'ACTIVITE .

On distingue essentiellement deux classes d'inhibiteurs des cholinestérases selon la nature des modifications qu'ils apportent à la cinétique de l'enzyme : les inhibiteurs compétitifs et les inhibiteurs non compétitifs.

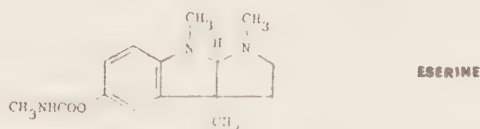
5.1. Inhibiteurs compétitifs.

Ces composés présentent fréquemment une certaine analogie

structurale avec l'acétylcholine, en particulier par l'existence d'un groupement ammonium quaternaire qui interagit avec le site anionique, de la même manière que le substrat. L'exemple classique de cette famille est représenté par la d-tubocurarine.



Mais ils peuvent se rattacher à d'autres structures, telles que les phénothiazines ou les carbamates dont l'ésérine est le chef de file.



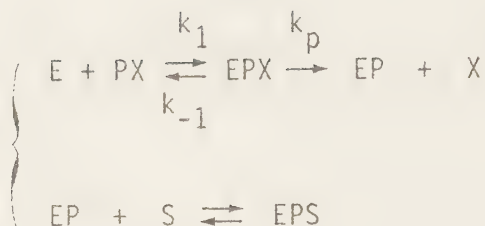
Ces inhibiteurs entrent en compétition avec le substrat au niveau des centres actifs. Leur fixation étant réversible, l'inhibiteur peut être déplacé en augmentant la concentration du substrat.

L'interaction ChE-inhibiteur a pour effet de diminuer l'affinité de l'enzyme pour le substrat. On observe donc une augmentation de K_m , par contre, V_{max} n'est pas affectée.

5.2. Inhibiteurs non compétitifs.

5.2.1. Mécanisme général d'action.

Les inhibiteurs non compétitifs (PX), composés organiques phosphorés, au contraire des précédents, ne gênent pas l'interaction enzyme-substrat et n'entraînent donc pas de modification de K_m , mais en se liant par covalence sur un élément du site estérasique (phosphorylation de la sérine), bloquent l'action catalytique de l'enzyme de façon irréversible. Cet effet revient à diminuer la concentration d'enzyme active ce qui, sur le plan cinétique, se traduit par un abaissement de V_{max} , le complexe EPS ne pouvant être transformé.



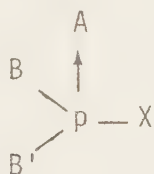
La formation du complexe EPX dépend de l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur que l'on mesure par la constante d'affinité $K_a = k_1 / k_{-1}$.

La formation du complexe EP, enzyme phosphorylée, dépend de la constante de phosphorylation k_p . Le rapport de ces deux constantes détermine la constante d'inhibition K_i de l'inhibiteur pour l'enzyme considérée.

$$K_i = \frac{k_p}{K_a}$$

5.2.2. Structure.

Ces inhibiteurs présentent une structure générale commune.



Dans laquelle :

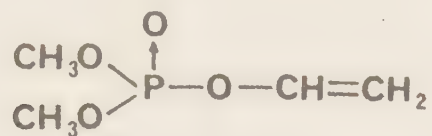
- A est un hétéroatome : l'oxygène pour les organophosphorés, le soufre chez les organosulfates et le sélénium pour les composés sélénophosphorés. Ces deux dernières classes ne sont des inhibiteurs des ChE qu'après biotransformation.
- X est le groupement le plus acide de la molécule, son pK_a est habituellement inférieur à 10. Ce groupement est libéré lorsque l'inhibiteur réagit avec l'enzyme.
- B et B' sont des groupements basiques, alkyles, alkoxy ou aminés.

Parmi ces composés, les plus importants sont les organophosphorés. Cette classe d'inhibiteurs a fait son apparition en 1937, en Allemagne, d'abord comme insecticides en remplacement de la poudre de pyrèthre, puis comme toxiques de guerre. Ce sont, actuellement avec

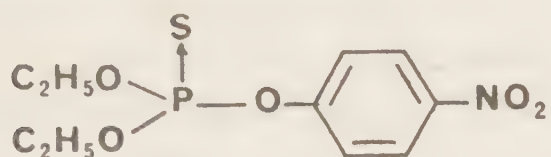
les toxines bactériennes, les poisons les plus puissants que l'on connaisse. Ce sont des liquides parfois très volatils ou d'aspect huileux, très instables en solution aqueuse.

Parmi les insecticides, citons :

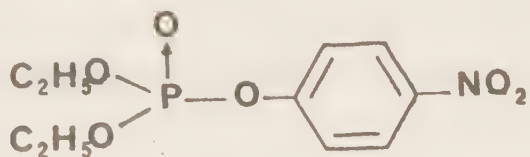
- le dichlorvos ou DDVP



- le parathion ou Thiophos

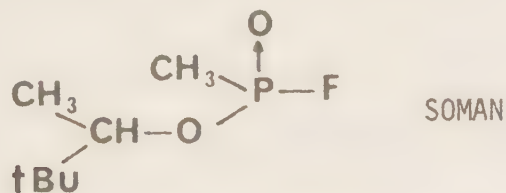


- le paraoxon, utilisé également en thérapeutique comme agent cholinergique ou miotique.

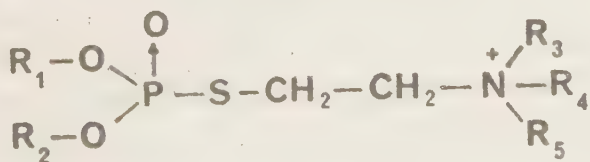


Les toxiques de guerre se rangent en deux catégories :

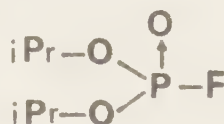
- les composés G possèdent la structure classique et sont représentés par le Tabun, le Sarin et le Soman.



- Les composés A (V dans la nomenclature américaine) se rattachent aux phosphothioalkylamines tel que l'Amiton ou la série des VX, phosphorylthiocholines, qui sont de 100 à 1000 fois plus toxiques que le sarin.



Enfin, parmi les organophosphorés, citons le DFP, diisopropyl-fluorophosphate, inhibiteur des enzymes à sérine que l'on utilise pour le marquage et le titrage des sites actifs.



5.2.3. Toxicité.

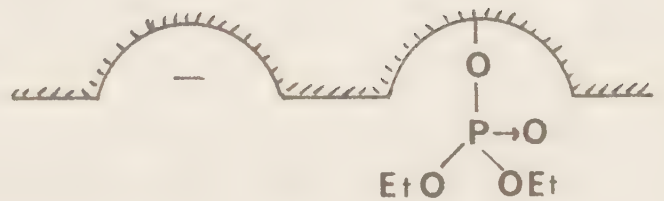
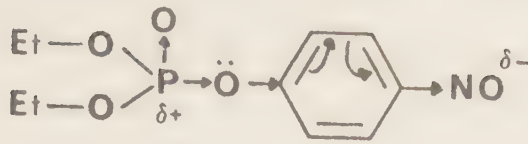
La plus grande partie de la toxicité de ces composés est liée à leur action inhibitrice vis-à-vis des AChE du système nerveux. Leur action parasymphomimétique indirecte détermine une intoxication de type cholinergique maximum. Il existe certainement un autre mode d'action secondaire, probablement par potentialisation de l'action de l'histamine et de la sérotonine. Les signes cliniques majeurs de l'intoxication se rapportent aux trois principaux niveaux d'action du toxique :

- . Signes muscariniques :
 - bradycardie
 - augmentation du tonus des muscles lisses provoquant myosis et bronchospasme;
 - hypersécrétion salivaire et nasale.
- . Signes nicotiniques et neuromusculaires :
 - myoclonie
 - paralysie respiratoire, cause la plus fréquente de la mort.
- . Signes centraux :
 - anxiété
 - troubles épileptiformes.

Le mécanisme de l'inhibition des cholinestérases par ces composés est, dans l'ensemble, bien connu.

Ainsi, le Parathion (O'BRIEN, 1967) subit d'abord une transformation en Paraoxon sous l'influence des enzymes des microsomes hépatiques. Au niveau de la cholinestérase, il y a d'abord une fixation globale et lâche. Puis l'attraction électronique exercée par le groupe nitro facilitant la rupture de la liaison P-O, la fonction alcool de

la sérine du site estérasique est phosphorylée par le phosphate de diéthyle libéré.



5.2.4. Thérapeutique de l'intoxication.

La thérapeutique de l'intoxication par les organophosphorés est double. Elle repose, d'une part sur un traitement symptomatique qui est également applicable dans l'intoxication par les carbamates, visant à combattre les effets périphériques et centraux de l'acétylcholine, d'autre part sur un traitement causal ayant une action réactivatrice directe au niveau de l'enzyme.

Le traitement symptomatique

Il fait essentiellement appel à l'action parasympholytique de l'atropine et aux tranquillisants Diazépam et Bénétyzine; le premier, outre son action tranquillisante, est anticonvulsivant et le second exerce une action atropinique au niveau des récepteurs muscariniques centraux et périphériques. L'assistance respiratoire associée vise au maintien des champs respiratoires en attendant que cesse la paralysie musculaire.

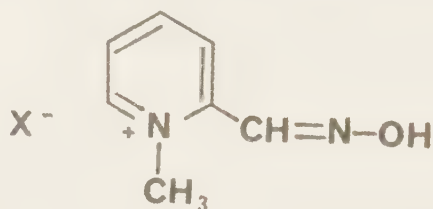
Les recherches actuelles ont pour objectif de s'opposer à la libération de l'acétylcholine par les synaptosomes et d'inhiber la choline-acétyl transférase, enzyme responsable de la synthèse du médiateur dans la synapse (SCHOENE et al. 1977).

Le traitement causal

La déphosphorylation de l'enzyme nécessite l'emploi d'agents

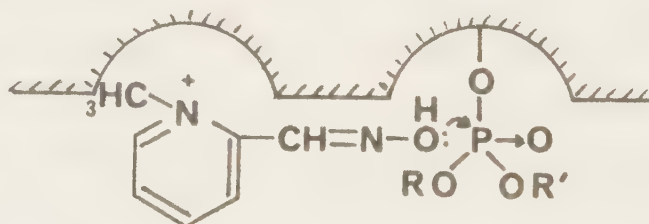
nucléophiles. Parmi les composés étudiés les oximes, particulièrement les oximes pyridiniques, ont été retenues (ELLIN & WILLS, 1964).

Les plus utilisés sont les sels de la pralidoxime (N-méthyl pyridinium 2-aldoxime) : le PAM et le Contrathion.

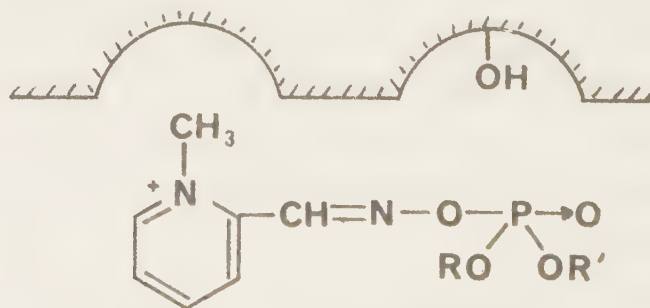


Ces oximes agissent par deux mécanismes. Le premier, indirect, a pour effet de potentialiser l'action de l'atropine, le second, direct, consiste à décrocher de l'enzyme le groupement phosphoryle.

Dans un premier temps, il se forme un complexe enzyme - inhibiteur - réactivateur (EIR).



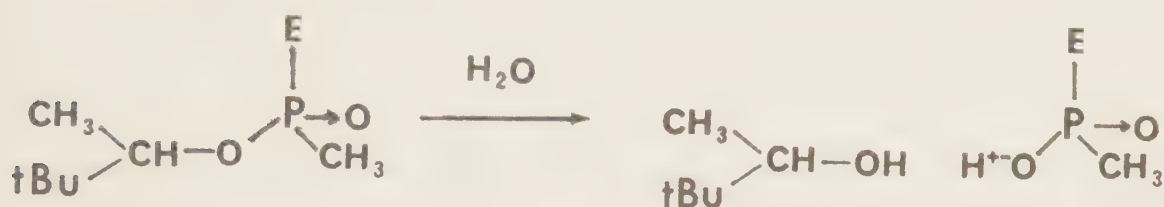
Puis le groupement nucléophile attaque l'atome de phosphore, l'enzyme est déphosphorylée et IR libéré.



Cependant, l'effet de cette thérapeutique reste limité aux cholinestérases périphériques, car les oximes passent difficilement la barrière hémocéphalique. D'autre part, la combinaison entre l'oxime et le résidu d'organophosphoré peut engendrer des composés toxiques également inhibiteurs des cholinestérases. Enfin, les oximes

ne peuvent décrocher certains organophosphorés : après un temps de contact plus ou moins long entre l'enzyme et le toxique, la réactivation de la cholinestérase devient difficile. On a donné à ce phénomène le nom d' "aging" ou vieillissement.

L' "aging" a pour cause une déalkylation par hydrolyse spontanée d'un groupement alkoxy de l'enzyme phosphorylée : ainsi, pour le Soman dont l' "aging" est de une minute, il y a départ du groupement pinacoloxyle.



La charge négative portée par la forme agée confère un caractère négatif à l'atome de phosphore et, de ce fait, l'attaque par les agents nucléophiles est impossible.

L' "aging" dépend d'un certain nombre de paramètres :

- de la nature et de l'origine de l'enzyme : en général, pour un même inhibiteur, les BuChE ont un aging plus rapide que les AChE;
- de la température, du pH;
- de la force ionique dont l'élévation le favorise et semble intervenir en modifiant l'état d'ionisation de certains résidus aminoacides (KEIJER et al. 1974);
- de la nature des substituants de l'atome de phosphore.

La recherche de nouveaux toxiques de guerre est d'ailleurs, en partie, axée sur la modification des substituants afin de rendre difficile, voire impossible, la réactivation.



CHAPITRE III

HETEROGENEITE

Le problème de l'existence des formes multiples ayant été posé dans le chapitre précédent, il nous a paru nécessaire, pour la suite de l'exposé, afin d'éclaircir notre démarche expérimentale et de faciliter la discussion, d'énoncer les bases moléculaires de l'hétérogénéité des protéines, en préalable à l'étude de l'hétérogénéité, proprement dite, de la Butyrylcholinestérase, sous ses aspects génétiques, moléculaires et catalytiques.

1. BASES MOLÉCULAIRES DE L'HETEROGENEITE DES PROTEINES.

L'hétérogénéité de la Butyrylcholinestérase peut avoir plusieurs origines et dépendre de modifications siégeant à différents niveaux génétiques et moléculaires. Il importe donc dans ce chapitre de définir les bases de l'hétérogénéité des protéines et d'étudier les mécanismes qui gouvernent son expression. L'intérêt d'un tel développement est double. Dans l'immédiat, il nous permettra de mieux saisir l'évolution des hypothèses et des concepts qui ont guidé la découverte des formes multiples de la BuChE. Pour notre travail expérimental, il a constitué une base de réflexion pour l'orientation des idées et le choix des méthodes d'étude ainsi qu'un précieux outil de critique pour l'analyse et la synthèse des résultats.

C'est MEISTER en 1950 qui, le premier, mit en évidence le polymorphisme moléculaire d'une enzyme en découvrant l'hétérogénéité de la lactico-déshydrogénase (LDH) de coeur de boeuf. En raison de l'insuffisance des techniques, cette hétérogénéité fut attribuée à des contaminants ou à des enzymes partiellement dégradées. Il fallut attendre 1959 pour que MARKERT & MØLLER, en couplant l'électrophorèse sur gel d'amidon, mise au point par SMITHIES (1955), à des techniques histochimiques de coloration, découvrent la réalité du polymorphisme de la LDH et introduisent le terme d'isoenzyme pour désigner ces formes électrophorétiquement distinctes, possédant des propriétés catalytiques identiques et appartenant au même organisme. L'introduction en 1964 de l'électrophorèse annulaire en gel de polyacrylamide par ORNSTEIN & DAVIS fit progresser, de façon considérable, l'étude des isoenzymes par sa facilité de mise en oeuvre et son grand pouvoir de résolution.

L'étude des isoenzymes ne se limita pas seulement au seul polymorphisme électrophorétique principalement lié à la charge électrique nette. L'utilisation des différentes techniques de chromatographie sur gel, d'électrophorèse en gradient d'acrylamide, les études cinétiques et physicochimiques permirent d'accéder à des niveaux structuraux supérieurs et de démontrer l'ubiquité du polymorphisme enzymatique. KAPLAN (1968) et LEESE (1969) considèrent que cette multiplicité enzymatique est un phénomène général et que l'existence d'une protéine sous une forme unique serait un fait tout à fait exceptionnel. Ces auteurs tout en reconnaissant que le déterminisme de ces formes peut être génétique ou épigénétique (post-transcriptionnel) constatent la complexité des systèmes décrits, s'interrogent sur la signification biologique des isoenzymes et pensent qu'elles doivent jouer un rôle au sein de systèmes de régulation.

1.1. Formes génétiquement déterminées.

Chacun connaît l'aphorisme de BEADLE & TATUM "un gène - une enzyme" qui, dans les années quarante, résumait le principe fondamental de la génétique biochimique. Cette hypothèse, une des plus fructueuses de la biologie moléculaire, doit maintenant être formulée de façon différente depuis que l'on connaît la réalité d'

un contrôle par plusieurs gènes de l'expression phénotypique du génotype et l'existence d'enzymes oligomériques constituées de plusieurs chaînes polypeptidiques différant dans leur structure primaire. Il convient donc de dire "un gène - une chaîne polypeptidique" ou plus précisément, étant donné l'existence de la transcription polycistronique, "un cistron - une chaîne polypeptidique", ce qui à la limite pourrait être formulé par "un codon - un acide aminé". Cependant, les progrès accomplis ces dernières années dans le domaine de la détermination des séquences d'acides nucléiques ont permis à une équipe de Cambridge d'établir la correspondance entre la structure primaire de l'ADN du phage ϕ X 174 et la structure primaire de certaines protéines codées par ce génome. Il s'avère qu'un même fragment d'ADN code pour deux protéines D et E. La même séquence nucléotidique contient donc l'information pour les deux protéines et le déchiffrement est rendu possible par le décalage d'une base dans la lecture des triplets.

Si au premier abord un tel système semble réaliser une économie de matériel génétique, il suppose d'un point de vue évolutif de très fortes contraintes car toute mutation au niveau d'une base pourra avoir des conséquences au niveau de la séquence d'acides aminés des deux protéines (GALIBERT, 1977). S'il est actuellement impossible de se faire une opinion du degré de généralisation de ce système et bien qu'il semble correspondre à une situation primitive (ou de régression) on ne peut a priori exclure son existence chez les eucaryotes et en particulier chez les mammifères (FIDDES, 1978). Le gène ou le cistron peut donc se définir comme une séquence polynucléotidique portant une information.

En fait, si l'on admet le concept selon lequel chaque enzyme monomérique ou homo-oligomérique est codée par un gène et que celui-ci peut se dupliquer ou par mutation produire des allèles fonctionnels, dans les deux cas une évolution divergente se produit; on arrive à la conclusion que toute enzyme peut éventuellement exister sous forme d'isoenzymes (MARKERT, 1975), ou allélozymes selon la nouvelle terminologie (IUPAC-IUB, 1977); ce qui peut expliquer en partie l'hétérogénéité liée à la variation génétique. Ces isoenzymes et les gènes qui les contrôlent sont alors soumis à la pression de sélection liée à l'

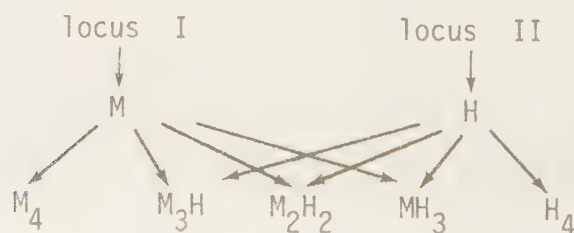
évolution qui va façonner la structure de la molécule de l'enzyme afin de l'adapter au contrôle optimal du métabolisme dans lequel elle est engagée. Cette catégorie est très homogène dans ses propriétés catalytiques et physicochimiques et les différences dans la structure primaire faibles.

Cependant, toutes les enzymes hétéroooligomériques ne procèdent pas du même mécanisme;elles peuvent être sous la dépendance de loci génétiques séparés et leur multiplicité est directement reliée aux différences dans la nature des gènes. A l'opposé de la catégorie précédente, l'évolution de ces gènes est nécessairement convergente. L'un d'eux restant stable pour assurer la survie de l'organisme tandis que l'autre, par mutations successives, se rapproche fonctionnellement du premier (KENNEY, 1974). La structure primaire, les propriétés catalytiques et immunologiques sont très différentes.

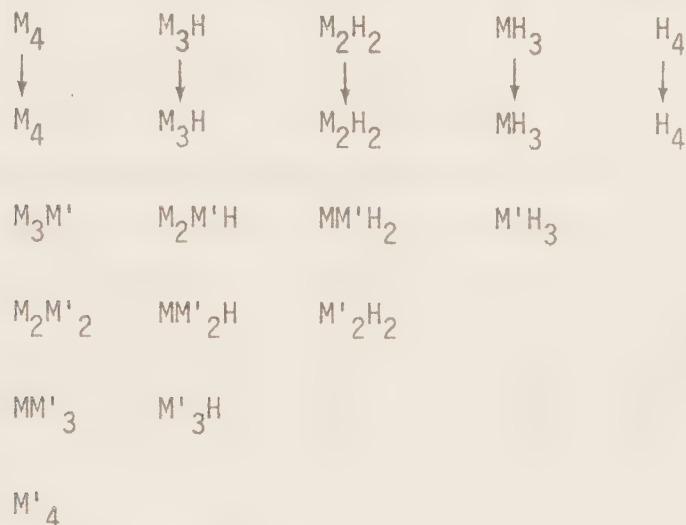
On peut citer deux exemples : le premier est un cas de polyallélisme, le second, système isoenzymatique le mieux étudié, est un système à loci multiples.

a) Les phosphatases acides des érythrocytes proviennent de trois gènes alléliques qui, par combinaison, déterminent six génotypes auxquels correspondent six phénotypes.

b) La LDH du sérum humain se révèle, à l'électrophorèse, composée de 5 isoenzymes (MARKERT, 1968). Ces isoenzymes de structure tétramérique proviennent de l'agrégation au hasard de deux sous-unités distinctes M (muscle) et H (heart). Par traitement à l'urée 12 M ou au chlorhydrate de guanidine 5 M, chaque isoenzyme est dissociée en ses quatre sous-unités de masse moléculaire 36000, mais de composition en aminoacides différente. La synthèse de ces chaînes est sous la dépendance de deux loci qui ne semblent pas appartenir au même opéron



Une mutation sur un des deux allèles d'un des loci, par exemple du locus I, va provoquer la transition $M \rightarrow M'$ et l'électrophorèse du sérum révélera un système de variants génétiques constitué de 15 bandes.



Dans le cas où les quatre allèles muteraient, on obtiendrait un système largement dégénéré constitué de 35 bandes.

Le nombre i d'isoenzymes obtenues par l'association au hasard de différentes sous-unités s pour former des oligomères de rang p , peut être calculé par la formule ou la table de SHAW (1964).

				s			
				1	2	3	4
i = $\frac{(s + p - 1)!}{p!(s - 1)!}$	∞	2		1	3	6	10
	p	∞	3	1	4	10	20
		∞	4	1	5	15	35

Si l'on admet que chacune des sous-unités a la même activité spécifique, l'intensité relative des bandes électrophorétiques dérivant de 2 sous-unités combinées au hasard suivra la simple expansion du binôme. Pour le dimère, on aura 1/2/1, pour le tétramère 1/4/6/4/1 etc...

1.2. Formes déterminées par des facteurs épigénétiques.

Une fois que la chaîne polypeptidique est synthétisée, elle peut subir un certain nombre de modifications et d'altérations généra-

trices de formes enzymatiques nouvelles. Ces formes, qui ne répondent plus à la définition d'isoenzymes (IUPAC-IUB, 1971), sont très nombreuses; toutes ne sont pas naturelles et leur multiplicité résulte parfois des procédés de purification, d'analyse, ou sont simplement dues à la présence d'artefacts.

1.2.1. Conjugaison de l'enzyme avec d'autres molécules.

Les protéines peuvent se lier de façon spécifique avec d'autres molécules et la conséquence peut être une modification de leurs propriétés physiques ou chimiques. Ces molécules peuvent être: des cofacteurs qui, le plus souvent chargés, modifient les propriétés électrophorétiques de l'enzyme, des substrats, des sucres, des lipides comme, par exemple, les lipoprotéines sériques ou d'autres protéines qui jouent un rôle dans leur transport.

1.2.2. Modification enzymatique d'une chaîne polypeptidique.

C'est le cas de l'activation des prozymogènes en formes actives sous l'influence d'enzymes protéolytiques qui, par le clivage d'une ou de plusieurs liaisons peptidiques démasquent le centre actif de l'enzyme. L'exemple le plus typique est celui de l'activation du chymotrypsinogène A qui engendre une famille de chymotrypsines sous l'action de la trypsine, mais on peut citer celui, également bien connu, de l'activation en cascade des facteurs de la coagulation sanguine, ainsi que le système de découverte plus récente d'activation du coagulogène de *Limulus* (TAI et al., 1977).

1.2.3. Modification de certains résidus terminaux ou latéraux.

Des modifications secondaires à une action enzymatique peuvent affecter la protéine sans altérer la séquence ni faire apparaître plusieurs chaînes. Ces modifications portent sur certains aminoacides ou sur des sucres (ou leurs dérivés) périphériques dans le cas des glycoprotéines.

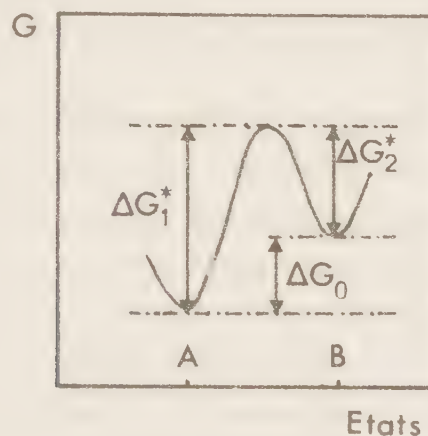
Un exemple est donné par les deux formes de l'aldolase (LAI, 1974). Leur séquence est la même mais, chez l'une d'elles, une asparagine est désamidée. Le groupement carboxylique libéré en apportant une

charge négative entraîne une modification de la mobilité électrophorétique de l'enzyme qui se remarque d'autant plus que l'enzyme est un homotétramère.

1.2.4. Modifications conformationnelles.

Ces protéines ont une séquence unique; leurs propriétés catalytiques sont voisines mais, en solution, elles existent sous plusieurs formes de conformation thermodynamiquement stables (EPSTEIN, 1968).

On sait qu'en solution une protéine adopte une structure tridimensionnelle telle que son énergie libre (G) soit minimale. Aux deux états A et B, dont les énergies libres sont minimales, correspondent, pour une protéine donnée, respectivement, une conformation stable et une autre métastable.



ΔG_1^* représente l'énergie libre d'activation pour le passage $A \rightarrow B$

ΔG_2^* représente l'énergie nécessaire à la transition inverse $B \rightarrow A$

Leur différence correspond à ΔG_0 , la variation d'énergie libre standard entre A et B avec K, la constante d'équilibre du système.

$$\Delta G_0 = - RT \log K \quad A \rightleftharpoons B$$

Si ΔG_1^* et ΔG_2^* sont relativement importantes, les deux espèces A et B apparaissent stables et peuvent coexister.

On distingue deux types de conformères :

- le premier se réfère aux enzymes subissant des variations conformationnelles sous l'induction de ligands et concerne principalement les enzymes allostériques;

- le second type se rapporte aux conformères "vrais", c'est-à-dire aux enzymes dont la chaîne polypeptidique adopte spontanément deux conformations stables.

Les différences dans la structure tertiaire des conformères déterminant des modifications de leur charge électrique par masquage ou exposition de groupes chargés, ainsi qu'une géométrie différente, leur étude est aisée par électrophorèse, ultracentrifugation ou dispersion rotatoire.

1.2.5. Artefacts de préparation ou d'analyse.

La plupart des modifications épigénétiques décrites précédemment peuvent avoir une origine artificielle.

Des phénomènes de dénaturation partielle, tels que la protéolyse, peuvent se produire in vitro. Les variations de la concentration de l'enzyme donnent fréquemment lieu à des associations ou dissociations. Enfin, l'enzyme peut interagir avec des molécules du tampon et, dans certaines conditions de pH et de force ionique, subir des variations de conformation. CANN & GOAD (1968) ont montré comment une protéine peut interagir réversiblement avec des molécules non dissociées d'un tampon acide et donner deux ou trois zones en électrophorèse.

1.2.6. Associations en structure quaternaire.

Les formes de cette classe très importante résultent de l'association d'une sous-unité en dimères, trimères, tétramères, aussi allons-nous nous attarder longuement sur le mécanisme de leur formation.

Leurs propriétés catalytiques sont identiques mais leur structure oligomérique est parfois à l'origine d'une coopérativité entre les protomères, génératrice de propriétés allostériques, parfois le monomère est inactif et c'est l'organisation en structure quaternaire qui permet à l'enzyme d'acquieser ses fonctions. La différence entre ces formes est essentiellement basée sur la masse moléculaire. Cependant, les tech-

niques d'analyse ne permettent pas toujours d'y accéder directement . La taille et la forme, surtout lorsqu'on met en oeuvre des techniques hydrodynamiques et électrophorétiques, influencent considérablement le comportement de la protéine que l'on étudie.

La structure quaternaire, outre la notion de hiérarchie qu'elle sous-entend, implique donc également la notion d'organisation géométrique des sous-unités.

1.3. Structure quaternaire .

1.3.1. Conditions de formation.

Une des conditions nécessaires à la formation d'un oligomère est que chacun des monomères possède un environnement équivalent ou pseudoéquivalent. Le nombre de zones de contact sur un monomère doit donc être nécessairement limité sinon il engendrerait des polymères formés d'un nombre N , très grand, de monomères.

Ces zones de contact qui assurent la liaison ou l'interaction des monomères entre eux, doivent également être de conformation très précise. La formation des oligomères s'accompagne donc de la création d'une symétrie moléculaire qui est en général de type axial avec des sous-unités organisées selon des arrangements cycliques, diédriques ou linéaires (KLOTZ, 1970; CORNISH-BOWDEN & KOSHLAND, 1971).

La connaissance de la nature des zones de contact implique la nécessité de déterminer le type de forces d'interaction et leur énergie, donc les groupements fonctionnels ou les aminoacides qui en font partie. Cette étude est importante car la formation des oligomères est un phénomène réversible, dépendant de nombreux facteurs, obéissant ou non à des processus coopératifs, et elle permet de comprendre ce qui peut changer l'affinité des monomères entre eux.

1.3.2. Environnement et nature des forces de liaison.

Les forces qui interviennent dans l'édification de cette structure peuvent être de nature covalente (ponts disulfures) ou ionique

mais ce sont surtout des liaisons de faible énergie, forces de VAN DER WAALS et liaisons hydrogène, qui s'établissent entre les sous-unités (YON, 1969). Cependant, les récentes études cristallographiques de CHOTHIA (1975) montrent que les aminoacids situés à l'interface sont tassés sur eux-mêmes et occupent le même volume que leurs cristaux. Thermodynamiquement, la contribution des liaisons hydrophobes apparaît comme la plus importante. Les liaisons hydrogène et de VAN DER WAALS doivent donc surtout assurer la stéréospécificité de l'interaction.

Selon TANFORD (1961, pp. 457-525), la théorie de DEBYE-HUCKEL, en dépit des approximations dues au caractère macromoléculaire et non sphérique des protéines, permet de prévoir le comportement des oligomères en fonction de la nature de leur environnement.

L'énergie d'interaction très faible et variant en R^{-6} implique un contact très étroit entre les monomères. Sachant que ces molécules sont toujours chargées, il faut que les forces de répulsion soient négligeables pour éviter la dissociation. Selon la théorie de DEBYE-HUCKEL, toute surface chargée détermine un champ électrique $\vec{E}$, celui-ci est relié à la densité volumique de charges ρ et à la permittivité du milieu ϵ .

Dans le cas d'une distribution continue de charges, l'équation de POISSON, ici exprimée en système C.G.S., nous donne la relation qui existe entre le potentiel électrostatique et la densité de charge.

$$\nabla^2 \psi = - \frac{4 \pi \rho}{\epsilon}$$

La permittivité est reliée à la constante diélectrique D du milieu par la relation :

$$\epsilon = \epsilon_v \cdot \epsilon_r$$

$$\epsilon_r = D \quad (80 \text{ pour l'eau, } 1 \text{ pour le vide})$$

L'opérateur laplacien nabla décrit la variation du potentiel

dans les trois dimensions. Soit en coordonnées rectangulaires :

$$\nabla^2 \Psi = \frac{\partial^2 \Psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \Psi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \Psi}{\partial z^2}$$

En considérant que la surface du macro-ion est plane, on n'exprimera le gradient de potentiel que dans une seule direction :

$$\nabla^2 \Psi = \frac{\partial^2 \Psi}{\partial x^2}$$

La décroissance du potentiel en fonction de x suit une loi exponentielle :

$$\Psi = \Psi_0 e^{-Kx}$$

dans laquelle,

Ψ_0 représente le potentiel de surface

K le paramètre de DEBYE-HÜCKEL

$$K = \left[\frac{4\pi e^2 n_i Z_i^2}{\epsilon k T} \right]^{1/2}$$

e : charge de l'électron

n_i : nombre de molécules ionisées

Z_i : charge portée par chaque molécule ionisée

k : constante de BOLTZMANN

or,

$$n_i = \frac{m}{V} \cdot \mathcal{N} \cdot 10^{-3} = c_i \cdot \mathcal{N} \cdot 10^{-3}$$

c_i : concentration molaire d'un ion de charge Z_i

$\mathcal{N}$: nombre d'Avogadro

donc

$$K = \left[\frac{4\pi e^2 c_i Z_i^2 \mathcal{N}}{1000 \epsilon k T} \right]^{1/2}$$

or, l'expression de la force ionique s'écrit :

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_i c_i Z_i^2$$

en exprimant K en fonction de μ et de ϵ on obtient une nouvelle expression :

$$K = \left[\frac{8 \pi e^2 \mathcal{N}_0}{1000 k T} \right]^{1/2} \cdot \left[\frac{\mu}{\epsilon} \right]^{1/2}$$

$$K = f \left(\frac{\mu}{\epsilon} \right)^{1/2}$$

D'autre part, le potentiel de surface Ψ_0 dépend du nombre de charges réelles portées à la surface de la protéine (densité de charge superficielle σ_0), de la permittivité et de K qui, lui-même, dépend de la force ionique.

$$\Psi_0 = \frac{4 \pi \sigma_0}{\epsilon}$$

Cette expression du potentiel de surface est analogue à celle qui donne le potentiel de charge d'un condensateur plan ::

$$U = \frac{q}{\epsilon C}$$

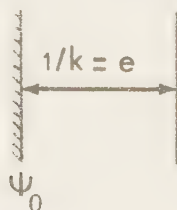
q : charge

C : capacité = $\frac{S}{e}$

S : surface des armatures

e : épaisseur du diélectrique

$\frac{1}{K}$ représente donc l'épaisseur du diélectrique, la distance par rapport à la surface de la protéine où le potentiel a décru d'un facteur exponentiel (BULL, 1971).



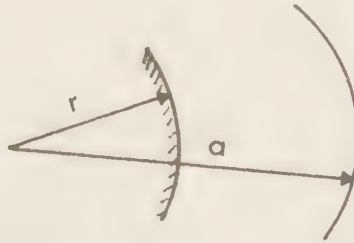
Donc, à pH constant, si l'on fait varier la force ionique ou la constante diélectrique du milieu, l'épaisseur de la couche $\frac{1}{K}$

va varier et le potentiel de surface aussi.

Si la surface n'est pas plane, et bien qu'il s'agisse de macromolécules, l'expression du potentiel est plus complexe.

$$\Psi = \Psi_0 \frac{r}{a} \cdot e^{-K(r-a)}$$

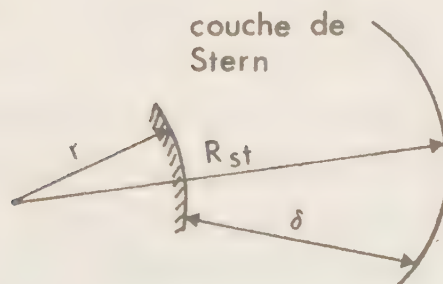
Si l'on introduit l'hypothèse de sphéricité, r représente le rayon de la protéine et a le rayon au point considéré.



Outre les facteurs géométriques le plus souvent difficiles à évaluer, l'expression du potentiel est en réalité plus complexe encore car, autour de la protéine existe une couche, dite couche de STERN, dans laquelle les phénomènes sont différents du reste de la solution. Dans cette couche, les molécules d'eau sont partiellement organisées en cages et la fixation d'ions à la surface de la protéine solvatée détermine une atmosphère d'épaisseur définie relativement solidaire de la protéine dans ses déplacements (SHAW, 1969).

Pour une protéine globulaire, on définit le rayon de STERN:

$$R_{st} = r + \delta$$

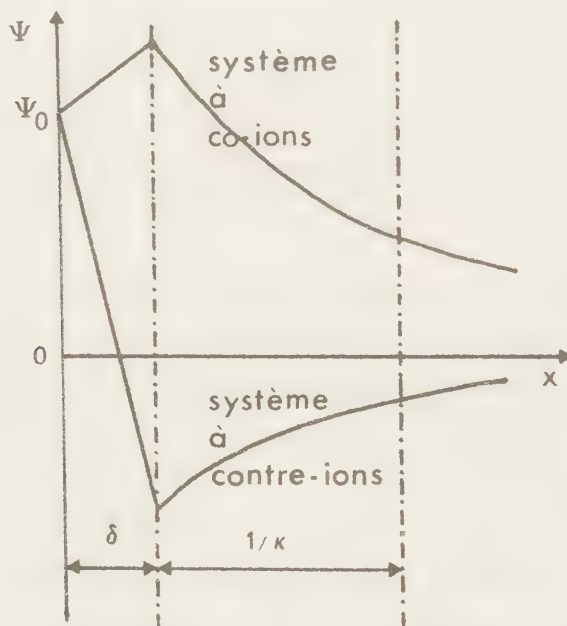


Au-delà de la sphère de STERN, on définit la sphère électrocinétique de potentiel zeta.

$$\zeta = \frac{4 \pi \sigma}{\epsilon K}$$

La variation du potentiel sera linéaire de la surface de la protéine à la zone extérieure de la couche de STERN, et c'est seulement au-delà qu'elle sera exponentielle.

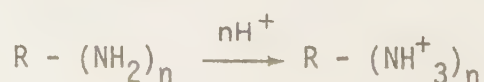
Cependant, la surface de la protéine peut adsorber des ions de même signe (co-ions) ou de signe contraire (contre-ions) qui vont modifier complètement le potentiel de la couche de STERN entraînant son augmentation ou son inversion.



La théorie de DEBYE-HÜCKEL permet donc de prévoir la stabilité des oligomères en fonction de la nature du milieu, en montrant l'importance fondamentale du pH, de la nature de l'électrolyte, de la force ionique, de la constante diélectrique.

1.3.3. Rôle du pH.

En permettant l'ionisation des groupements périphériques, le pH détermine la charge nette de la protéine. Que l'on soit en milieu acide ou en milieu alcalin, plus on s'éloigne du point isoélectrique, plus cette charge augmente. Ainsi, en milieu acide, dans la zone de pH 2-4, toutes les charges de la protéine sont positives.



Au niveau des protomères d'un oligomère se crée une sphère de charges positives qui ont tendance à se répulser. A l'intérieur de la sphère où $\epsilon \approx 2$, le champ est élevé et une légère modification de la structure tertiaire diminue les zones d'interaction. La compétition inégale entre les forces d'interaction faibles au niveau des zones de contact et les forces de répulsion des charges positives de la surface entraîne la dissociation. En milieu alcalin, le problème est similaire.

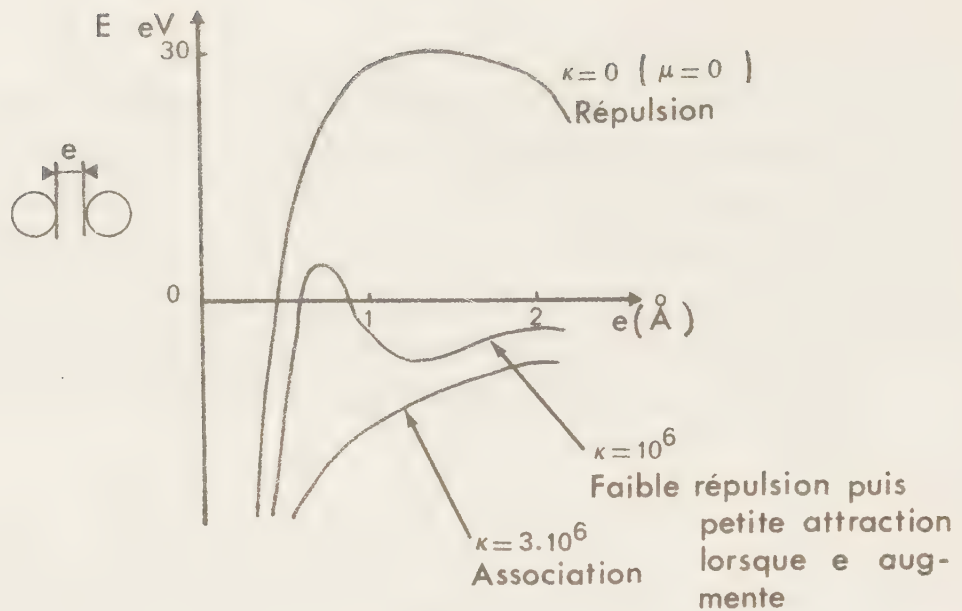
1.3.4. Rôle qualitatif de l'électrolyte .

La nature de l'électrolyte intervient par l'adsorption de certains ions qui modifient le potentiel.

1.3.5. Rôle de la force ionique .

La force ionique exerce une grande influence sur l'état d'agrégation en modifiant l'épaisseur de la double couche $1/K$, donc le potentiel. Quelle que soit l'énergie de répulsion, si l'on étudie un système en fonction de la force ionique, on constate qu'à force ionique faible la répulsion s'exerce à grande distance (K diminuant le potentiel de surface devient très élevé) alors qu'à force ionique élevée où K augmente, elle se fait à courte distance par suite de la diminution rapide du potentiel déjà peu élevé. Il en résulte qu'à faible force ionique, les systèmes oligomériques auront tendance à se dissocier alors que les forces ioniques élevées auront tendance à provoquer leur agrégation.

Le diagramme suivant montre la variation de l'énergie d'interaction de deux molécules de même taille en fonction de la distance qui les sépare pour différentes valeurs de K .



1.3.6. Rôle de la constante diélectrique .

L'incorporation de solvant organique au milieu entraîne une diminution de la constante diélectrique. Le potentiel va augmenter mais moins vite qu'il ne le devrait car K subit également une augmentation qui tend à le freiner. Le résultat est quand même une répulsion à plus grande distance avec dissociation.

Ce phénomène est parfois renforcé par l'action compétitrice du soluté (l'urée par exemple) pour la formation de liaisons hydrogène avec les aminoacides entraînant une désorganisation de la structure secondaire.

1.3.7. Les différents types d'associations quaternaires.

Les conditions du milieu réunies, il n'y aura oligomérisation que si le système possède en lui-même cette potentialité. L'autoassemblage est sujet à des contraintes thermodynamiques liées à la nature des aminoacides de la périphérie et à la conformation de la protéine déterminée, en partie, par le rapport de polarité des aminoacides internes et externes (FISCHER, 1964).

La nature de cette périphérie moléculaire et, en particulier, de celle qui participe aux zones de contact, est à l'origine de différents types d'associations quaternaires, caractérisées par l'importance

de la variation de l'énergie libre intrinsèque $\Delta G^\circ_{\text{int.}}$ qui se produit à chaque étape de l'oligomérisation.

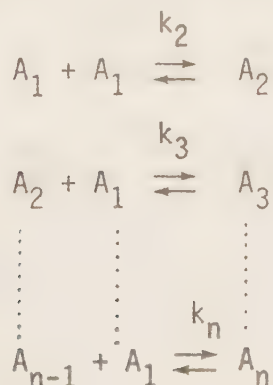
On définit ainsi trois types d'associations (KLOTZ , 1975) :

1. Les associations non coopératives chez lesquelles, à chaque étape du processus d'agrégation, les sous-unités sont fixées avec le même $\Delta G^\circ_{\text{m int.}}$.
2. Les associations coopératives chez lesquelles la fixation des sous-unités est facilitée par les précédentes et dont $\Delta G^\circ_{\text{m int.}}$ diminue à chaque étape.
3. Les associations obstructives ou anticoopératives qui correspondent à un processus inverse et dont la variation d'énergie libre doit être de plus en plus grande pour que les monomères se fixent.

On peut déterminer à quel type d'association se rattache une série de polymères par le calcul des constantes d'association k_i d'où l'on tire la variation d'énergie libre.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln k_i$$

Soit la séquence d'oligomérisation dont chaque étape est sous la dépendance d'une constante d'équilibre k_i .



On définit le paramètre de coopérativité α par le rapport

$$\alpha = \frac{k_{i+1}}{k_i}$$

Si la constante d'association d' A_1 pour chaque n-mère est la même, $\alpha = 1$ et l'association est acoopérative.

Si $k_{i+1} > k_i$, on aura $\alpha > 1$ et le processus d'association sera coopératif; dans le cas contraire avec $\alpha < 1$, le processus sera obstructif et ne pourra pas conduire l'oligomérisation à terme.

Ecrivons

$$k_2 \cdot k_3 \dots k_i = \frac{A_2}{A_1 \cdot A_1} \cdot \frac{A_3}{A_2 \cdot A_1} \dots \frac{A_i}{A_{i-1} \cdot A_1}$$

soit

$$\prod_2^i k_j = \frac{A_i}{[A_1]^i} \text{ ou } A_i = [A_1]^i \cdot \prod_2^i k_j$$

$$\text{or, } k_i = \alpha k_{i-1}$$

Pour l'ensemble des $i-1$ constantes nous aurons :

$$\begin{array}{lll} k_3 & = & \alpha k_2 \\ k_4 & = & \alpha k_3 = \alpha^2 k_2 \\ \vdots & & \vdots \\ k_i & = & \alpha k_{i-1} = \alpha^{i-2} k_2 \end{array}$$

Donc,

$$\begin{aligned} A_1 &= \alpha k_2 \cdot \alpha^2 k_2 \dots \alpha^{i-2} k_2 \cdot [A_1]^1 \\ &= k_2^{i-1} (\alpha \cdot \alpha^2 \dots \alpha^{i-2}) \cdot [A_1]^i \end{aligned}$$

Or, le produit

$$\alpha \cdot \alpha^2 \cdot \alpha^3 \dots \alpha^{i-2} = \alpha^\sigma$$

dans lequel, $\sigma = 1 + 2 + \dots + (i-2) = \frac{(i-1)(i-2)}{2}$

soit finalement :

$$A_i = k_2^{i-1} \cdot \alpha^\sigma \cdot [A_1]^i$$

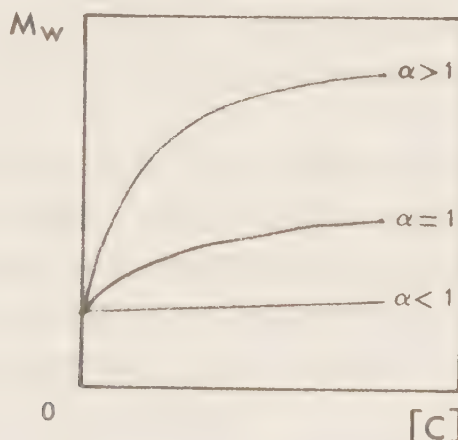
Ce qui nous permet d'écrire l'équilibre entre le monomère et le n-mère en fonction d'une seule constante complexe K_i

$$K_i = k_2^{i-1} \cdot \alpha^\sigma$$

et

$$A_i = K_i \cdot [A_1]^i$$

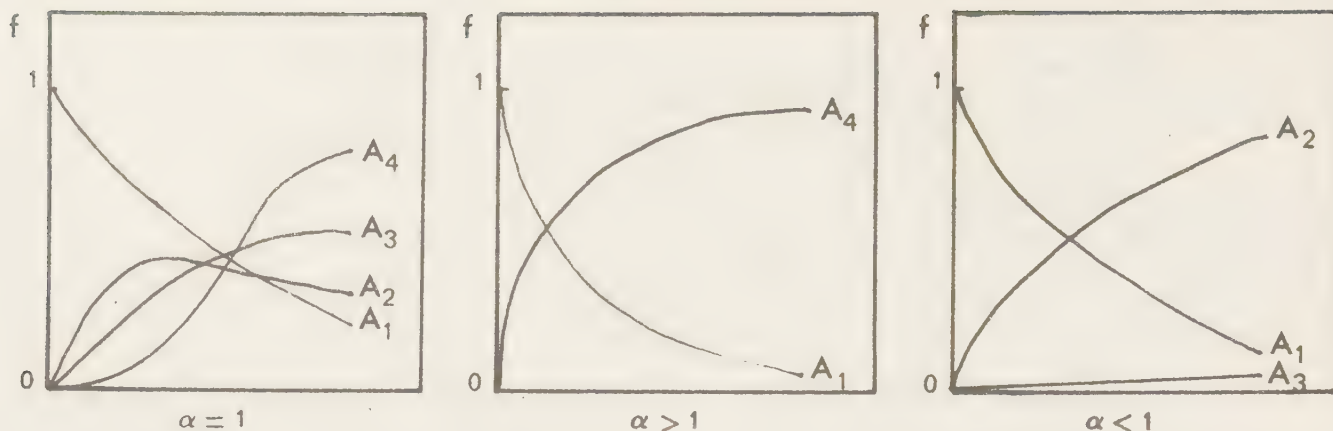
Ainsi, il sera possible de suivre la variation de la masse moléculaire apparente en poids ($M_w = \sum n_i M_i^2 / \sum n_i M_i$) en fonction de la concentration. Les valeurs obtenues dépendront du paramètre de coopérativité α .



On constate donc que lorsque $\alpha > 1$, on atteint très rapidement le dernier terme de la série, alors que pour $\alpha = 1$, les différents stades coexistent et le système est polydispersé.

L'étude parallèle de la fraction molaire permet de déterminer de façon plus précise, l'évolution des différentes populations en fonction de la concentration totale.

Ainsi, pour un tétramère :



Le passage d'une forme à l'autre correspond à une variation d'énergie libre

$$\Delta(\Delta G^\circ) = RT \ln \frac{k_{i+1}}{k_i} = RT \ln \alpha$$

Celle-ci est très faible; une infime modification de la surface des zones de contact intermonomériques peut être suffisante pour produire un tel incrément, c'est-à-dire modifier l'état de coopérativité.

Différents facteurs interviennent dans la détermination de la nature des zones de contact et l'on distingue :

- des facteurs intrinsèques liés à la nature des aminoacides constitutifs de la chaîne polypeptidique. La structure primaire est la condition nécessaire et suffisante à l'induction d'une structure tridimensionnelle. La formation de la structure quaternaire dépendra donc des potentialités qui sont inscrites à ce niveau.

- Des facteurs extrinsèques. Nous avons évoqué le rôle primordial de la force ionique, du pH et de la constante diélectrique du milieu; il faut mentionner celui, plus spécifique, des ligands (substrats, inhibiteurs) qui, en se fixant sur les protomères, peuvent induire des transformations à l'origine de phénomènes d'association, de dissociation ou de coopérativité.

1. 4. Rôle et signification biologique.

La question essentielle qui vient maintenant et qui ne concerne pas seulement la structure quaternaire mais également les isoen-

zymes dans leur ensemble, est de connaître le pourquoi de leur existence. S'il semble évident que certaines des formes décrites n'ont pas d'existence réelle in vivo, ou aucun rôle biologique, les deux classes les plus importantes, les isoenzymes génétiquement distinctes, ainsi que les associations en structure quaternaire, doivent retenir toute notre attention. Le fait que l'hétérogénéité des premières soit principalement tissulaire ou cellulaire et soumise à une évolution au cours de l'embryogénèse suggère leur participation à des phénomènes de régulation métabolique. Ceci semble parfaitement établi pour ce qui concerne les LDH (SHAW, 1969) dont les propriétés catalytiques et la répartition tissulaire de chacune laisse supposer que la forme présente dans un tissu est celle qui correspond le mieux à sa fonction. Pour d'autres enzymes, on rencontre ce phénomène de compartimentation métabolique à l'intérieur de la cellule elle-même.

En ce qui concerne les structures quaternaires la potentialité d'oligomérisation étant inscrite dans la séquence du monomère, l'association, en créant une ou plusieurs espèces protéiques nouvelles, réalise une économie de matériel génétique. L'avantage génétique n'est pas seulement d'ordre économique mais il est aussi défensif. Il s'agit de limiter les risques et les effets des mutations. Le risque de mutation encouru par une protéine constituée de 1000 résidus d'acides aminés est plus grand que celui d'un oligomère comprenant 10 chaînes de 100 résidus chacune (KLOTZ, 1975). Enfin, et ici nous rejoignons les isoenzymes vraies, l'oligomérisation peut être à l'origine de phénomènes de coopérativité qui déterminent, chez ces protéines, des propriétés régulatrices efficaces et économiques.

En résumé, on peut dresser un tableau déterminant 8 classes possibles d'isoenzymes ou de formes multiples, selon les quatre niveaux de structure des protéines.

A - Structure primaire

1. Modification de la séquence : variants de séquence ou isoenzymes vraies, selon l'IUPAC-IUB (1971).

- Protomériques ou homooligomériques.
- Hybrides (hétérooligomériques).

2. Modification des groupes terminaux ou des chaînes latérales.

- Substitution : amidation, (Asp $\leftrightarrow$ Asn, Glu $\leftrightarrow$ Gln), acylation, sulfatation, hydroxylation
- Décarboxylation.
- Conjugaison à des sucres, lipides, nucléotides.
- Liaison covalente à un groupement prosthétique.

3. Variation de la longueur de la chaîne.

- Variations génétiques provoquées par l'apparition d'un codon stop.
- Variations épigénétiques hydrolytiques (autocatalyse, protéolyse).

B - Structure secondaire : Formes isomériques ou résultant d'interactions non covalentes.

1. Hélicomères.

- Interaction avec des ligands spécifiques ou non, ou avec des protéines.
- Dénaturation partielle : formes de transition entre la structure globulinique et la pelote statistique.

C - Structure tertiaire

1. Isomères .

- Les liaisons covalentes internes : pontage par ponts disulfures, liaisons amides, (thio) ester/lactone
- Conformères : induits par des ligands non covalents ou formes métastables naturelles.

D - Structure quaternaire

1. Oligomères.

- Covalents.
- Non covalents.

2. Epimères.

- Covalents.
- Non covalents.

3. Isomères.

- Par pontage de type disulfure ou autre.
- Conformères.

2. HETEROGENEITE MOLECULAIRE DE LA BUTYRYLCHOLINESTERASE DU SERUM.

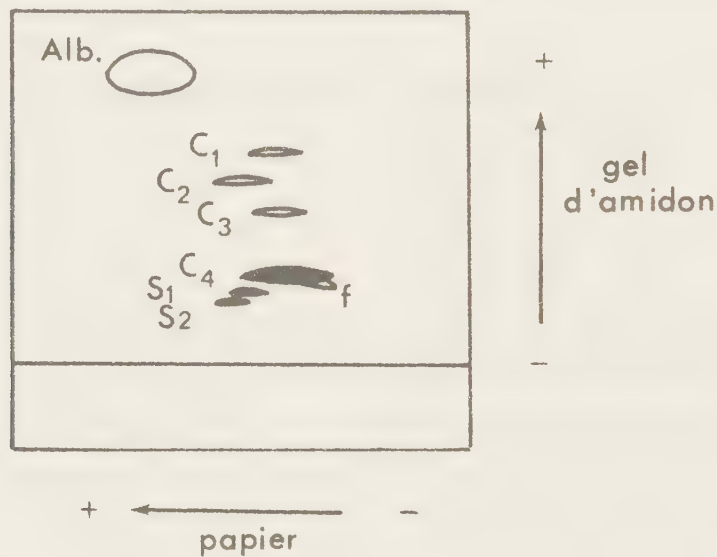
C'est avec le progrès décisif des techniques d'électrophorèse, lié à l'introduction des gels d'amidon, puis de polyacrylamide, que l'hétérogénéité moléculaire de la BuChE fut découverte.

2.1. L'hétérogénéité électrophorétique, reflet de l'hétérogénéité moléculaire .

Par électrophorèse sur papier, on savait que la BuChE migrait à pH 8,6 dans la région des α_2 - β globulines (SWENSMARK, 1965, pp. 14-22), mais jusque vers les années 1958-1960, l'enzyme était décrite comme une espèce protéique unique. Un premier essai de séparation des estérases du sérum humain sur gel d'amidon, par DUBBS et al. en 1960, fit apparaître la BuChE sous forme d'un doublet dans la région $\alpha\beta$. Un an plus tard, BERNSOHN et al. (1961), toujours sur gel d'amidon, parviennent à identifier 6 zones avec la BuSch et 7 avec l'ASch, dont les sensibilités diffèrent avec les inhibiteurs. Les propriétés de tamis moléculaire du gel d'amidon étant connues, les auteurs émettent, pour la première fois, l'hypothèse que ces différentes zones cholinestérasiques peuvent correspondre à des espèces moléculaires distinctes ou bien résulter du transport de l'enzyme par des protéines inertes.

En 1962, HARRIS et al., combinant l'électrophorèse sur papier et sur gel d'amidon, détectent, avec l' α -naphtylacétate, 4 zones qu'ils dénomment, par ordre de mobilité décroissante, C_1 , C_2 , C_3 et C_4 . La majeure partie de l'activité est située au niveau de C_4 et toutes sont inhibées par l'ésérine à $10^{-5}M$. De la même façon que BERNSOHN et al., ces auteurs mettent en évidence une activité au niveau de l'albumine. La nature de celle-ci semble complexe. Non inhibée par l'ésérine, elle ne correspond apparemment pas à une BuChE et, de surcroît, le traitement à la neuraminidase, s'il affecte les autres formes, reste sans effet sur elle. Cette zone représente peut-

être l'albumine-estérase de WILDE & KERWICK (1962) mais, selon AUGUSTINSSON (1958), elle serait en réalité composée de plusieurs enzymes. Enfin, dans les sérums conservés au froid apparaissent, au bout de quelque temps, deux nouvelles zones S_1 et S_2 dont la mobilité est plus faible que C_4 . Dans quelques cas, il est également observé, à l'état de trace, une forme supplémentaire de mobilité inférieure à C_4 , la zone f . Celle-ci est très importante chez le fœtus et le nouveau-né et son orientation oblique indique qu'elle présente, vraisemblablement, elle-même une microhétérogénéité.



L'année suivante, HARRIS & ROBSON (1963), sur la base de leurs résultats précédents, formulent l'hypothèse selon laquelle les quatre formes séparées sur gel d'amidon diffèrent par leur charge électrique mais aussi par leur taille. Leur démonstration est simple. Soumettant le sérum humain à la filtration sur gel de Séphadex G-200, ils recueillent dans un premier pic, suivant de près le volume mort, la majorité de l'activité; mais obtiennent aussi deux autres pics d'élution retardée et de moindre intensité. Ces fractions éluées et collectées sont ensuite soumises à l'électrophorèse sur gel d'amidon. Le pic d'élution majoritaire se révèle constitué de la forme C_4 ; au deuxième pic correspond C_3 et C_2 et, enfin, le troisième et dernier pic ne renferme que C_1 .

Entre l'électrophorèse sur gel d'amidon et la filtration sur gel, les résultats apparaissent en parfaite corrélation, indiquant que les composantes de la BuChE diffèrent dans leurs tailles relatives

selon la séquence $C_4 > C_3 > C_2 > C_1$.

La même année, sur une préparation d'AChE d'*Electrophorus electricus*, LAWLER (1963) démontre, par ultracentrifugation analytique et diffusion de la lumière, la nature polydispersée de l'enzyme et avance que ce caractère peut être la conséquence d'une structure constituée d'agrégats de sous-unités identiques.

Au travers de ces premiers résultats, il apparaît donc que l'hétérogénéité électrophorétique est le reflet d'une hétérogénéité moléculaire et que chaque forme diffère des autres par sa taille.

2.2. La complexité croissante du problème.

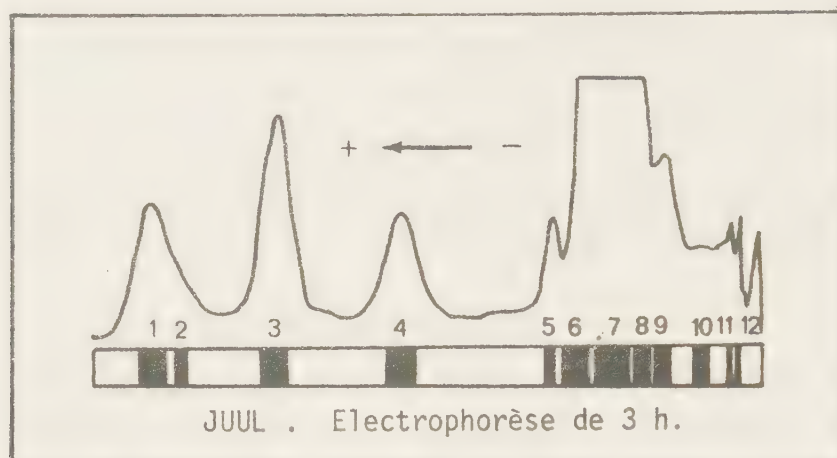
Dès 1963, l'étude comparative de HESS et al. vient apporter la preuve de l'existence de l'hétérogénéité de la BuChE chez plusieurs mammifères et montre la constance de certains caractères de l'enzyme.

Chez le cheval, OKI et al. (1965) mettent en évidence 5 formes, $C_1 \rightarrow C_5$, ainsi qu'au niveau de l'albumine, une enzyme non inhibée par l'ésérine et le TEPP et pouvant correspondre à cette albumine-estérase qui existe chez l'homme. Par contre, STOSICK et al. (1969) ne voient que trois formes par électrophorèse en flux continu.

VAN ROSS & DRUET (1966), améliorant la technique d'électrophorèse bidimensionnelle sur papier et gel d'amidon selon le système de POULIK, caractérisent 7 formes dans le sérum humain.

L'introduction du gel de polyacrylamide provoque une nouvelle évolution, en même temps que s'accroît la perplexité des chercheurs devant l'inflation du nombre d'isoenzymes ou de formes multiples qu'ils parviennent à détecter. Ainsi JUUL (1968), en pratiquant des électrophorèses selon ORNSTEIN & DAVIS (1964), mais avec un gel de séparation à $T = 9,16\%$, un tampon circulant TRIS 0,041 M - glycolle 0,533 M, pH 8,4 et une intensité de 3 mA/tube, individualise, sur des durées de 3 heures, 12 zones d'activité cholinestérasique dans le plas-

ma humain dont 78 % de l'activité localisée au niveau de ChE-7.

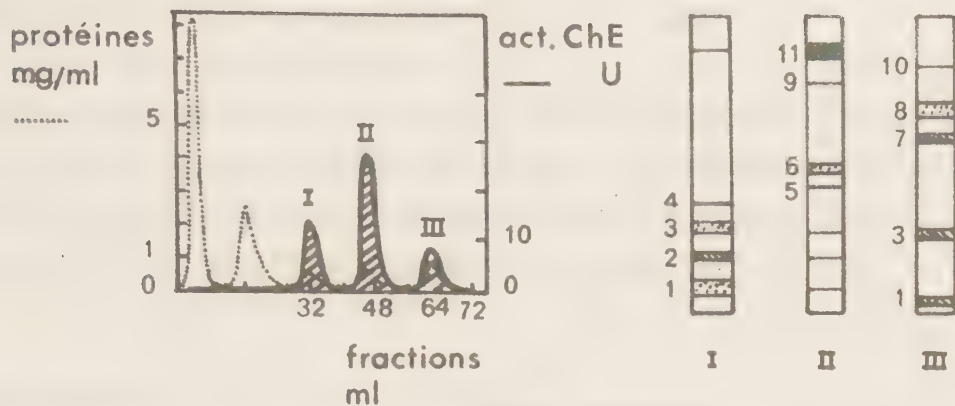


Les hypothèses mises en place les années précédentes vacillent. La nature des formes multiples de la BuChE semble plus complexe qu'on ne l'imaginait. Les hypothèses initiales : protéines de tailles différentes par polymérisation d'une sous-unité identique ou par fixation sur des protéines de transport, ne sont pas écartées, mais il s'en ajoute de nouvelles. Ces différentes isoenzymes peuvent, en effet, se former au cours même de la procédure de séparation; elles peuvent être aussi des précurseurs ou des produits de dégradation de l'enzyme.

Appliquant la technique de JUUL aux sérums du poulet, de différents mammifères et de l'homme, VINCENT et al. (1970a, 1970b, 1971) confirment, pour l'homme, les résultats de JUUL, mais soulignent que la zone principale (formes n° 8 à 12) est, en réalité, constituée de 2 zones importantes plus ou moins bien séparées, suivies de 3 autres, et que les formes rapides s'ordonnent en doublets. Chez les animaux étudiés, ils trouvent un polymorphisme analogue constitué de 9 bandes pour le cheval, 6 chez le chien, 7 chez le lapin, 9 chez le cobaye, 8 chez le rat et 6 chez le poulet.

A peu près en même temps, LOBANOV et al. (1971) mettent en évidence 11 formes chez l'homme et 10 chez le rat, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, mais n'en obtiennent que 3 par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Sephadex A-50. Cependant, dans une publication de 1972, en soumettant les fractions de chromatographie à l'analyse par électrophorèse, ils retrouvent les 11 fractions

du sérum humain, mais dans un ordre apparemment incohérent.



En 1974, NAGY et al. obtiennent un résultat semblable à celui de JUUL par électrophorèse en gradient discontinu d'acrylamide 5-7,5 - 9 %, à pH 8,4 (TRIS 0,0041 M - glycocolle 0,053).

2.3. La recherche d'une explication moléculaire.

On peut évidemment se poser la question de savoir si le nombre croissant mais très variable de formes qui ont été détectées en gel de polyacrylamide, n'est pas dû en particulier à des artefacts liés aux conditions d'électrophorèse ou sous la dépendance de la spécificité et de la sensibilité des techniques de révélation mises en oeuvre.

Ainsi, à propos de la publication de JUUL, si VINCENT et al. ainsi que NAGY et al. confirment les résultats obtenus, DAS & LIDDELL (1970), avec une technique électrophorétique très voisine ($T = 7,5$ %, tampon circulant TRIS 0,005 M - glycocolle 0,038 M, pH 8,4) sur des temps de 2-3 heures et une intensité de 5 mA/tube, mais faisant appel à l' α -naphtylacétate pour la détection des enzymes, n'identifient que les quatre formes classiques C_1 à C_4 . GAFFNEY (1970) également avec la méthode d'ORNSTEIN & DAVIS à $T = 7,5$ % pratiquée 90 minutes et 5 mA/tube, visualise 7 composants, grâce à la technique de révélation de JUUL (complexes thiocholine - cuivre).

SAEED et al. (1971), dans des conditions différentes, avec un système continu de pH (TRIS 0,15 M-EDTA-borate ajusté à pH 7,4 par HCl 0,1 M) et en opérant 18 heures à $+4^\circ\text{C}$, sous 2,5-3 V/cm, ne

détecte que 5 formes avec la technique de JUUL.

Dans les quatre premières publications rapportées précédemment, les auteurs ont utilisé une même technique électrophorétique, celle d'ORNSTEIN & DAVIS, en n'introduisant que quelques modifications portant sur la molarité du tampon de circulation, la concentration du gel, l'intensité du courant ou la durée de l'opération. Les résultats publiés ne concordent apparemment pas et leurs différences ne semblent pas tenir aux techniques de révélation de l'activité.

Dans une communication technique, MUKHAMEDJANOV (1971) souligne que le nombre de formes de la BuChE que l'on sépare sur gel de polyacrylamide est fonction de la concentration du gel. En principe on peut en détecter de 3 à 7. Avec une concentration en gel comprise entre 8 et 10 %, c'est le chiffre 5 qui est le plus fréquent. Cette explication sous-entend que les formes qui apparaissent ou disparaissent selon la concentration, doivent très faiblement différer dans leur charge, leur dimension ou leur masse moléculaire.

La cause de cette hétérogénéité peut être liée à la nature du tampon (tampons TRIS-glycocolle de molarité variable selon les auteurs) et à la durée de l'électrophorèse. Les travaux de CANN (1968, 1975) font ressortir que l'interaction réversible des protéines avec des molécules du tampon engendre, au cours du temps, une série d'équilibres à l'origine de l'apparition de deux ou plusieurs bandes pour une protéine.

Ce mécanisme pourrait expliquer le dédoublement des formes rapides observé sur les diagrammes de JUUL et de VINCENT et al., mais il semble difficilement transposable d'un système à un autre : WEBER & TRELA (1976) en gel à 7,5 % avec un tampon circulant TRIS 0,0184 M - acide succinique 0,01 M, pH 6,5, pendant 90 minutes, sous une intensité de 2,5 mA/tube, obtiennent avec l' α -naphylacétate, le même résultat que DAS & LIDDELL (1970).

S'il n'est pas impossible que les conditions physicochimiques de l'électrophorèse puissent produire des artefacts et expliquer certaines bandes, les variations de la mobilité électrophorétique en fonc-

tion de la porosité du gel ainsi que les données de la filtration sur gel, indiquent que les formes les plus distinctes diffèrent d'abord dans leur taille.

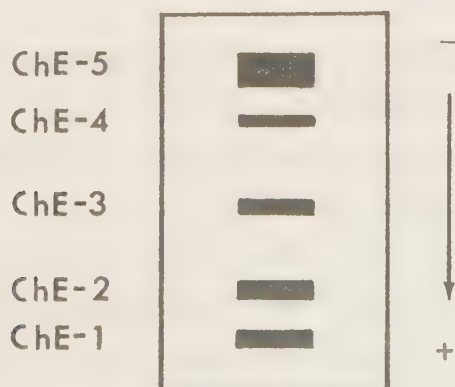
Le dédoublement de certaines bandes, que nous évoquions plus haut, peut être l'expression de l'existence de conformères et le fait que DAS & LIDDELL (1970) aient mesuré deux points isoélectriques (3,99 et 4,3) pour C_4 est en accord avec cette hypothèse.

Il semble également que deux nouvelles formes de mobilité plus faible que C_4 apparaissent au cours du temps lorsque le sérum est conservé au froid. HARRIS et al. (1962), les premiers, ont noté l'apparition de ces zones S_1 et S_2 . D'autres auteurs en font mention (VAN ROSS & DRUET, 1966, WEBER & TRELA, 1976, LA MOTTA et al., 1968). La nature et le mécanisme de formation de ces nouvelles formes ne sont toujours pas connus.

2.4. La nature oligomérique de la Butyrylcholinestérase.

C'est incontestablement à LA MOTTA que revient le mérite d'avoir, le premier, entrepris l'étude physicochimique des formes multiples de la BuChE du sérum humain et dégagé les idées essentielles.

En 1965, LA MOTTA et al., sur une enzyme purifiée par chromatographie et électrophorèse préparative, mettent en évidence 5 bandes sur gel d'amidon qu'ils dénomment, par ordre de mobilité décroissante, ChE-1 à ChE-5. Les quatre premières sont totalement inhibées par l'é-sérine 10^{-5} M, alors que ChE-5 ne l'est que partiellement.



Chacune de ces formes, prélevée avant coloration et soumise à une nouvelle électrophorèse, migre sur une distance identique à la première électrophorèse mais, sur certaines préparations, une interconversion est observée.

Les quatre formes les plus rapides, concentrées par précipitation au sulfate d'ammonium à 65 % de saturation et soumises à l'électrophorèse, sont toutes converties en ChE-5. Inversement, ChE-5 peut être convertie en n'importe quelle forme rapide.

Cette tendance suggère à LA MOTTA et al. que ces formes multiples représentent une séquence de polymérisation née de l'agrégation progressive d'une unique sous-unité active.

Dans leur publication de 1968, LA MOTTA et al. confirment les résultats précédents et, dans une préparation commerciale purifiée (SIGMA, type II), mettent en évidence deux nouvelles formes de mobilité plus faible que ChE-5. Toutes deux sont convertibles en ChE-5 après concentration mais, à la différence des autres formes, elles ne semblent pas différer par leur taille de ChE-5; elles apparaissent plutôt en être des dérivés très proches. Les auteurs admettent qu'il peut s'agir de conformères de ChE-5.

Deux ans plus tard, LA MOTTA et al. (1970), en déterminant les constantes de sédimentation et les masses moléculaires des 5 formes par ultracentrifugation en gradient de saccharose, vérifient la justesse de l'hypothèse de HARRIS & ROBSON (1963).

Les formes multiples de la BuChE du sérum diffèrent essentiellement par leur taille.

L'examen des différences de masse moléculaire entre deux formes consécutives révèle depuis ChE-1 jusqu'à ChE-5, une séquence en progression régulière dont les termes diffèrent de $+n$, $+2n$, $+n$, $+2n$; avec $n \simeq 30000$.

LA MOTTA et al. ne se prononcent pas quant à la nature de n et $2n$ qui peuvent différer totalement dans leur composition ou représenter une relation monomère-dimère.

	S	M	ΔM	points isoélectriques	
				sérum natif	après traitement à la NANase
ChE-1	5,2	82000	n	4,1	6,7
ChE-2	6,6	110000		3,9	5,2
ChE-3	8,4	170000	2n	4,0	6,2
ChE-4	9,9	200000	n	4,1	6,1
ChE-5	11,3	260000	2n	4,0	6,9

BOUTIN & BRODEUR (1971), par filtration sur membrane semi-perméable, montrent que le sérum humain renferme au moins deux formes actives interconvertibles. Une forme majeure de masse moléculaire supérieure à 100000 et qu'ils estiment, par filtration sur gel de Sephadex G-200, à 348000, et une forme mineure dont la taille correspondant à une protéine de masse moléculaire comprise entre 50000 et 100000 est estimée à 86000 par filtration sur gel. Si l'on admet que la fraction la plus lourde est un polymère de la forme légère, cette forme majoritaire apparaît tétramérique. Cette hypothèse est en contradiction avec les résultats de LA MOTTA et al. : Il y a bien identité structurale des monomères mais, chez LA MOTTA, la séquence de polymérisation ainsi que les masses moléculaires de ChE-1 et ChE-5 ne traduisent apparemment pas de relation monomère-tétramère.

Cependant, les expériences de SCOTT & POWERS (1972) d'hybridation du C_4 natif avec C_4 traité à la neuraminidase montrent des électrophorégrammes à cinq bandes, en accord avec une structure tétramérique.

Les travaux de MAIN et al. (1972) sur la BuChE du sérum de cheval viennent confirmer ceux de BOUTIN & BRODEUR. La masse moléculaire de la forme majoritaire purifiée est estimée par filtration sur gel de Sepharose 6B à 315000. Par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS une seule zone est détectée et elle correspond à une sous-unité de 77300. La forme majoritaire est donc bien homotétramérique.

Si les termes extrêmes de la séquence de polymérisation semblent explicables, la nature des formes intermédiaires reste encore inconnue.

Les points isoélectriques que LA MOTTA & WORONICK (1971) ont déterminé pour les 5 formes ne diffèrent pas significativement de $4,0 \pm 0,1$. Après traitement du sérum à la neuraminidase, on assiste à une élévation du pI de toutes les formes, la forme majoritaire passant à 6,9. Les masses moléculaires ne sont pas affectées par ce traitement et les auteurs concluent que l'acide N-acétylneuraminique ne joue aucun rôle dans la détermination de l'état d'agrégation.

Les résultats de GAFFNEY (1970) sont, dans leur ensemble, en accord avec ceux de LA MOTTA mais ils divergent sur ce dernier point. Sur les 7 formes détectées, les 5 plus mobiles diffèrent par leur taille, mais l'acide N-acétylneuraminique doit jouer un rôle très important dans le maintien de leur stabilité car, après l'action de la neuraminidase, il ne persiste plus qu'une forme diffuse de mobilité voisine de ChE-5.

Les travaux de SAEED et al. (1971) compliquent encore le problème en l'orientant dans une autre direction. Sur les cinq formes identifiées, les quatre premières peuvent être produites sous l'action d'enzymes protéolytiques sur ChE-5. Selon ces auteurs, ces résultats n'impliquent pas nécessairement que $\text{ChE-1} \rightarrow 4$ soient des produits de la protéolyse physiologique de ChE-5; elles peuvent en effet représenter des formes précurseurs de ChE-5. Quoi qu'il en soit, les relations entre les différentes formes et leurs sous-unités apparaissent d'une grande complexité qu'il importe d'élucider.

2.5. Conclusion.

En conclusion, on est maintenant certain que les principales formes moléculaires de la BuChE du sérum humain diffèrent essentiellement par leur taille. La forme majoritaire, le C_4 (ou ChE-5) est tétramérique et probablement constituée d'un seul type de sous-

unité qui semble correspondre à C_1 (ou ChE-1). La nature des formes intermédiaires demeure inexpliquée et, bien que LA MOTTA et al.(1970) aient montré que les masses moléculaires progressent arithmétique-ment selon des raisons alternativement de n et $2n$, il faut être prudent sur la manière de les interpréter. En effet, l'application de la relation de MARTIN & AMES (1961) à la détermination des masses moléculaires à partir des constantes de sédimentation ne fournit que des valeurs approchées qui peuvent être erronées si les propriétés géométriques et l'hydratation des protéines examinées s'écartent de celles des marqueurs. Ainsi, le rapport des masses de ChE-1 et ChE-5 ne traduit pas de relation monomère-tétramère.

3. HETEROGENEITE CATALYTIQUE.

Très tôt, un certain nombre d'auteurs ont montré que des préparations de Butyrylcholinestérase, partiellement purifiées, ne suivaient pas la cinétique michaélienne.

Si la plupart des travaux font ressortir que la déviation de la cinétique de MICHAELIS-MENTEN est due à la coexistence de plusieurs enzymes dont les propriétés catalytiques diffèrent, certains auteurs avancent des théories basées sur des différences dans la nature et la réactivité des sites actifs ou imaginent l'enzyme dotée d'un comportement allostérique.

3.1. Théorie multimoléculaire .

En 1954, WILSON, sur la base d'études cinétiques, émet l'hypothèse que la Butyrylcholinestérase doit être constituée d'au moins deux enzymes.

BERRY, un peu plus tard, en 1960, utilisant la benzoylcholine et l'acétylcholine comme substrats, montre que les courbes $v = f(-\log S)$ présentent deux maxima et que les diagrammes de $v = f(v/S)$ ne sont pas linéaires mais convexes et traduisent la présence d'au

moins deux enzymes agissant indépendamment sur le même substrat. Les études avec des inhibiteurs de types carbamates et organophosphorés démontrent l'action différentielle de ces composés sur ces enzymes, et BERRY conclut à la présence de trois formes de cholinestérase dans le sérum humain.

CHRISTIAN et BEASLEY (1968), sur une préparation commerciale (SIGMA) de Butyrylcholinestérase du sérum humain, montrent que, pour des concentrations d'acétylcholine inférieures à $10^{-2}M$, la cinétique est michaelienne et que l'hydrolyse du substrat n'est due qu'à l'action d'une seule enzyme. Pour des concentrations supérieures, une deuxième enzyme entre en action et contribue, de façon significative, à la cinétique globale. Les diagrammes de LINEWEAVER-BURK présentent alors une cassure qui leur donne une allure hyperbolique. La cassure de la courbe est due à une augmentation de la vitesse d'hydrolyse par l'entrée en jeu de la deuxième enzyme dont l'activité ne se manifeste qu'aux concentrations élevées. Les deux enzymes présentent donc des K_m différents. La première, majoritaire et la plus active, a un $K_m = 2,0 \cdot 10^{-3}M$.

Enfin, plus récemment, LOBANOV et al. (1972), après purification de la cholinestérase du sérum humain par chromatographie d'échange d'ions, obtiennent trois fractions présentant chacune une microhétérogénéité électrophorétique et confirment les différences déjà observées dans les propriétés catalytiques de ces enzymes, ainsi que leur sensibilité vis-à-vis des inhibiteurs organophosphorés.

Les travaux effectués en parallèle sur la BuChE du sérum d'autres mammifères, vont dans le même sens. REINER & SEUFERTH, dès 1965, étudiant l'action des organophosphorés, concluent à l'existence, chez le cheval, de deux isoenzymes qui, selon leurs propres termes, diffèrent probablement par leur masse moléculaire et semblent formées d'agrégats de sous-unités semblables.

Par électrophorèse en flux continu, STOSICK et al. (1969) isolent, chez le cheval, trois formes d'affinité différentes pour le DFP.

MAIN (1969), travaillant sur trois enzymes différentes,

l'acétylcholinestérase érythrocytaire et la butyrylcholinestérase des sérums de l'homme et du cheval, démontre que leur inhibition par les organophosphorés ne suit pas une cinétique du premier ordre. Sur la base des travaux se rapportant à l'hétérogénéité moléculaire de ces enzymes, il montre qu'à un taux d'inhibition de 50 %, les courbes d'hydrolyse du substrat en fonction du temps se résolvent en quatre composantes linéaires pour les enzymes sériques. Chaque composante suit une cinétique du premier ordre dont la constante de premier ordre, définie expérimentalement, s'exprime par la relation classique :

$$\rho = 2,3 \frac{(\log v_0 - \log v)}{t}$$

La vitesse d'hydrolyse mesurée expérimentalement, après un temps t d'incubation, est la somme des vitesses individuelles des différentes enzymes :

$$\begin{aligned} \sum v &= v^I + v^{II} + \dots + v^N \\ &= v_0^I e^{-\rho_I t} + v_0^{II} e^{-\rho_{II} t} + v_0^N e^{-\rho_N t} \end{aligned}$$

Les courbes $\log \sum v = f(t)$ montrent que l'on est en présence d'un système multimoléculaire avec cependant une forme prédominante qui ne détermine qu'une faible déviation par rapport à la linéarité.

La technique imaginée par CHIU et al. (1972 a) permet d'approcher la question de la contribution de chaque enzyme à l'activité totale du système. Ainsi, CHIU et al. (1972 b), par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, séparent quatre formes de BuChE dans le sérum de cheval, déterminent leurs paramètres cinétiques par densitométrie des gels et testent leur sensibilité aux organophosphorés.

Le tableau suivant résume ces travaux.

ISOENZYMES (par ordre de mobilité croissante)	$K_m \cdot 10^4$ M	V_{max} (unités arbitraires)	% d'activité (a)
I	$2,46 \pm 0,73$	$2,96 \pm 0,29$	63
II	$7,62 \pm 1,19$	$1,24 \pm 0,10$	20
III	$6,21 \pm 0,78$	$0,77 \pm 0,04$	12
IV	$12;14 \pm 1,64$	$0,38 \pm 0,03$	5

(a) Le pourcentage d'activité a été calculé sur la base de l'absorption relative des quatres formes sur le zymogramme qu'ils ont révélées par la réaction de KARNOVSKY & ROOTS (1964) avec, comme substrat, la butyrylthiocholine à 10^{-3} M .

3.2. Théorie des sites différents.

Avec un substrat plus spécifique que l'acétylcholine, la benzoylcholine, KALOW (1964), en étudiant la dépendance de l'hydrolyse sur le pH et la concentration, montre que la surface active de l'enzyme est plus complexe qu'on ne le pensait.

En effet, pour les concentrations élevées de benzoylcholine, il observe à la fois un recul du pH optimum et une diminution de l'activité. L'auteur envisage l'existence de 2 sites actifs différents permettant la formation de deux complexes enzyme-substrat dont les constantes d'ionisation différentes expliquent les variations d'activité avec le pH et la concentration du substrat. Mais KALOW n'écarter pas non plus l'hypothèse d'une certaine interdépendance des sites, la fixation du substrat sur le premier pouvant modifier l'état d'ionisation de certains groupements fonctionnels du second.

3.3. Théorie allostérique .

A l'origine de cette théorie de conception récente pour la BuChE, l'observation par AUGUSTINSSON en 1973 d'une cassure dans les

courbes $v = f(v/S)$ pouvant traduire l'existence de deux enzymes ou deux sites actifs par molécule.

Utilisant comme matériel une préparation hautement purifiée, AUGUSTISSON postule qu'elle est uniquement constituée de la forme tétramérique de l'enzyme. Les données de la cinétique à l'état stationnaire, le coefficient de HILL différent de 1 et les diagrammes de EADIE-AUGUSTINSSON-HOFSTEE non linéaires, sont comparés avec une série de modèles mathématiques testés statistiquement. Parmi ceux-ci, un seul cadre avec les données expérimentales et correspond à l'équation d'une espèce enzymatique unique possédant deux sites catalytiques.

$$v = \frac{v_1[S] + v_2[S]^2}{1 + K_1[S] + K_2[S]^2}$$

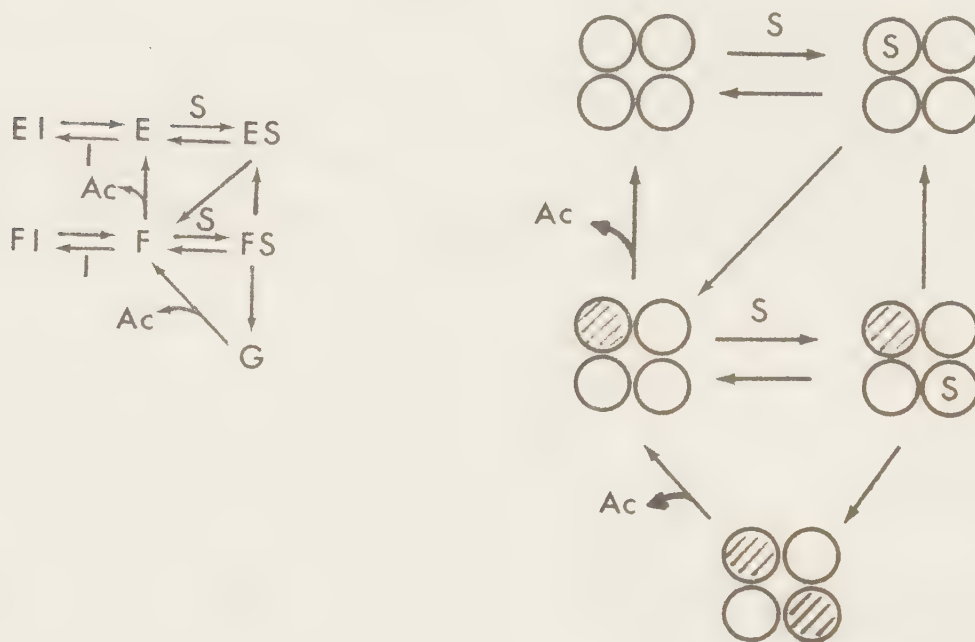
Sur la base des données expérimentales et du modèle choisi, AUGUSTINSSON (1974 et 1975) a pu, ainsi, proposer un mécanisme d'action cohérent.

L'enzyme est tétramérique et possède donc une paire de sites coopératifs. Elle apparaît donc comme un dimère de dimères, chacun ne possédant qu'une seule unité fonctionnelle. Cette hypothèse est en accord avec les résultats de MAIN et al. (1972) qui estiment à 2 le nombre de sites actifs pour la forme tétramérique de la BuChE du sérum de cheval, mais semble en contradiction avec ceux que cette équipe a obtenus en 1974.

Mécanisme :

Le substrat (S) ou l'inhibiteur compétitif (I) venant se fixer sur un des deux sites donne un complexe ES ou EI induisant une modification conformationnelle sur l'autre site qui prévient toute fixation de S ou de I. La fixation simultanée de deux molécules de substrats est donc impossible. L'hydrolyse du substrat laisse transitoirement le premier site acylé, ce qui permet cependant au second site de retrouver sa conformation originelle.

Cet intermédiaire acylé F peut fixer une deuxième molécule de S ou de I et donner naissance à un nouveau complexe FS ou FI. Après son hydrolyse, le dernier complexe G, enzyme diacylée, peut retourner à l'état initial E par désacylation, en passant par le complexe F intermédiaire.



Dans un autre domaine, les travaux de KAMARIĆ (1975) évoquent également un comportement allostérique pour l'enzyme du sérum de cheval.

3.4. Conclusion.

La théorie multimoléculaire fait apparaître l'hétérogénéité catalytique comme le reflet ou la conséquence de l'hétérogénéité moléculaire mais elle suppose que l'on soit en accord avec l'hypothèse selon laquelle les différentes formes enzymatiques ont chacune un comportement michaelien simple.

La théorie allostérique implique que l'enzyme n'existe que sous une seule forme, un tétramère qui possède une paire de sites catalytiques fonctionnant sur le modèle de la coopérativité homotrope. S'il est exact qu'il est techniquement possible de purifier l'enzyme tétramérique, plusieurs auteurs ont montré que le processus d'interconvertibilité des formes correspond à un équi-

bre entre la dissociation de la forme tétramérique et l'association des formes de rangs inférieurs.

Dans ces conditions, l'utilisation d'une préparation de l'enzyme tétramérique, même hautement purifiée, ne garantit aucunement que l'on est en présence du seul tétramère et rend incertaine, voire illusoire, toute tentative de modélisation.

En réalité, l'enzyme étant oligomérique, il n'est pas exclu qu'une certaine coopérativité existe entre les sites, mais il semble aventureux de conclure à son existence lorsque l'individualité de la forme tétramérique ne peut être démontrée de façon absolue.

Enfin, la démonstration de l'existence de différentes formes de BuChE dans le sérum ayant été apportée, et en admettant que les interactions du substrat avec les sites soient de type coopératif homotrope, il n'en demeure pas moins que, dans une préparation brute et a fortiori dans le sérum, la coexistence de ces différentes enzymes est à l'origine d'un comportement cinétique non michaelien. Donc, dans l'état actuel de nos connaissances, les deux théories sont toutes deux recevables.

4. HETEROGENEITE GENETIQUE .

Dans le premier chapitre, nous avons évoqué le fait que les individus sensibles au Suxaméthonium ont un taux de BuChE sérique anormalement bas. Ce fait clinique rapporté par EVANS (1953) fut à l'origine de la découverte, en 1957, par KALOW & GENEST, des premiers variants génétiques de cette enzyme.

Actuellement, on connaît au moins 5 gènes qui gouvernent la biosynthèse de la BuChE du sérum et situés sur deux loci indépendants, mais on n'en connaît toujours pas la signification (SIMPSON, 1968).

Le locus E_1 est occupé par quatre gènes autosomaux allé-

liques : le gène normal et ses trois variants allélomorphes :

- le gène E_1^u qui détermine l'enzyme normale ou usuelle;
- le gène E_1^a responsable de la synthèse de l'enzyme atypique qui résiste à la dibucaïne;
- le gène E_1^f de l'enzyme résistant au fluorure;
- le gène E_1^s variant silencieux dont l'activité est nulle chez les homozygotes.

Les combinaisons entre les différents allèles déterminent 10 génotypes possibles :

- Homozygotes : uu, aa, ff, ss;
- Hétérozygotes : ua, uf, us, af, as, fs.

Le locus E_2 n'est occupé que par le gène C_5 , variant non allélique, qui produit une forme supplémentaire de faible mobilité électrophorétique. Tous ces variants sont impliqués dans la réponse prolongée au Suxaméthonium.

4.1. Le variant atypique .

Ce variant fut le premier découvert par KALOW & GENET (1957), grâce à une technique d'inhibition différentielle. Utilisant la dibucaïne, un inhibiteur compétitif, les auteurs purent déterminer, dans une population, le "nombre de dibucaïne" de chaque enzyme, c'est-à-dire le pourcentage d'inhibition de l'hydrolyse de la benzoylcholine en présence de dibucaïne. Ils distinguèrent ainsi trois groupes d'individus présentant des nombres différents et correspondant respectivement aux homozygotes uu pourvus de l'enzyme normale usuelle fortement inhibée par la dibucaïne, aux hétérozygotes ua donnant une valeur intermédiaire, et aux homozygotes aa dont le "nombre de dibucaïne" apparaît faible. En 1971, GARRY a proposé une technique colorimétrique pour le dépistage de ces variants: l'activité du phénotype UU est identique en tampon phosphate et en tampon TRIS, alors qu'en tampon TRIS, le phénotype UA est inhibé à 13 % environ et l'homozygote atypique AA à 43 %.

Ce variant a été particulièrement bien étudié et les remarques qu'il appelle peuvent tout aussi bien s'appliquer aux autres allèles du locus E_1 qu'à lui-même. S'agissant d'un variant allélomorphe du gène E_1^u , on peut supposer que les différences structurales doivent être assez minimes. L'étude électrophorétique des variants est un domaine encore mal exploré, mais il semble que le comportement de l'enzyme atypique soit identique à celui de l'enzyme normale. L'homozygote AA est également constitué d'un système de formes multiples à trois composantes mineures et une majeure, et l'hétérozygote UA révèle, contre toute attente, un diagramme identique qui se superpose à ceux de UU et de UA. La mutation génétique n'affecte donc pas la structure tridimensionnelle et quaternaire de l'enzyme. DEWALD de l'équipe de LA DU a pu isoler (LA DU, 1971), par filtration sur Sephadex G-200, les différentes formes de l'enzyme usuelle et atypique et mesurer leur "nombre de dibucaïne" ainsi que leur K_m pour la benzoylcholine. Dans les deux cas, les fractions enzymatiques sortent avec les mêmes volumes d'élution, donc correspondent à des molécules de taille identique, et présentent des K_m et des "nombres de dibucaïne" de l'ordre de grandeur de ceux des sérums respectifs.

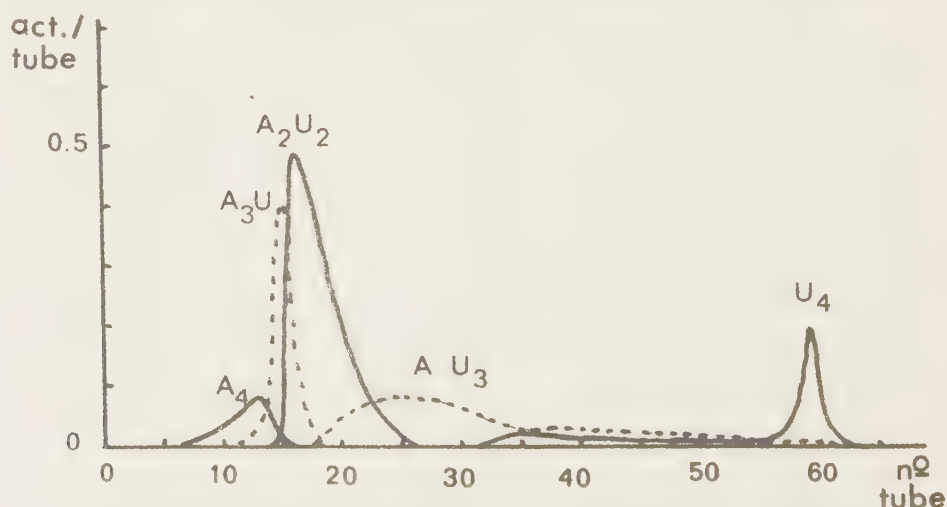
Génotype	Formes	"Nombre de dibucaïne"	BzCh K_m (μ M)
$E_1^u E_1^u$	Sérum	81,7	4,5
	C_4	81,7	4,1
	$C_2 + C_3$	80,6	5,1
	C_1	81,1	4,7
$E_1^a E_1^a$	Sérum	22,7	21,1
	C_4	17,8	24,1
	$C_2 + C_3$	15,6	24,2
	C_1	23,4	18,3

Le K_m de l'enzyme atypique est augmenté pour le substrat

et l'affinité pour l'inhibiteur est également plus faible. C'est donc bien au niveau du centre actif que porte la mutation. Il semble que l'activité catalytique du centre actif pour la dernière étape de l'hydrolyse du substrat, c'est-à-dire la dissociation hydrolytique du complexe acyl-enzyme, soit abaissée pour l'enzyme atypique. Ce phénomène peut être interprété comme la conséquence d'une distorsion du centre actif, peut-être simplement causée par la substitution d'un seul aminoacide.

Un nouvel argument expérimental en faveur de cette thèse a été apporté en 1975 par LA DU & CHOI. La chromatographie d'affinité d'un mélange de sérum d'homozygotes UU et AA sur sépharose 4B activé au bromure de cyanogène et couplé à un ligand du type diamino-caproyl-phényltriméthyl ammonium (ROSENBERRY & al., 1972) sépare, de façon très nette, les deux enzymes. Leur résolution est donc indiscutablement due à une différence qualitative de leurs sites actifs.

Les hétérozygotes UA ne montrent pas en chromatographie d'affinité deux pics comme précédemment, mais une série de 5 pics dont les "nombres de dibucaine" sont progressivement croissants et correspondent à la séquence A_4 , A_3U , A_2U_2 , AU_3 et U_4 . Les sous-unités A et U se combinent au hasard et se distribuent chacune dans le rapport 1/3/3/1. Les cinq espèces tétramériques sont donc dans le rapport 1/4/6/4/1.



Ce résultat constitue également une preuve supplémentaire en faveur de l'hypothèse sur la nature tétramérique du C_4 avancée en 1972 par SCOTT & POWERS.

Enfin, LOCKRIDGE & LA DU (1978) poursuivant leurs travaux viennent de montrer que la différence majeure existant entre les tétramères U_4 et A_4 se situe au niveau de la structure de leurs sites anioniques. En effet, l'affinité de ces enzymes pour leurs substrats n'est pas la même : d'une façon générale, la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (K_D) et la constante de Michaelis sont plus faibles pour l'enzyme usuelle que pour l'enzyme atypique. Les auteurs concluent que la diminution d'affinité de l'enzyme atypique peut être causée par la substitution d'un acide glutamique du site anionique par un aminoacide neutre.

4.2. Le variant résistant au fluorure.

En 1961, HARRIS & WHITTAKER découvrent deux nouveaux phénotypes caractérisés par leur résistance à l'inhibition par le fluorure de sodium. Comme pour les variants précédents, il est défini un "nombre de fluorure" qui représente le pourcentage d'inhibition de l'activité de l'enzyme en présence de fluorure.

4.3. Le variant silencieux .

C'est LIDDELL, en 1962, qui, le premier, met en évidence un individu homozygote pour le gène silencieux. En principe, l'activité sérique de la BuChE est nulle chez ces individus; toutefois, une faible activité similaire à celle de l'AChE a pu être observée chez certains porteurs de ce gène.

4.4. Le variant C_5^+

Découvert en 1962 par HARRIS et al., par électrophorèse bidimensionnelle où il se distingue du C_4 par sa mobilité plus faible.

Le locus E_2 fonctionne indépendamment du locus E_1 ; associé à l'expression de ce gène, on retrouve tous les phénotypes du premier locus (HARRIS et al., 1963).

L'étude complète des propriétés fonctionnelles de la forme

tétramérique de C_5 purifiée a été menée en parallèle à celle de C_4 par SCOTT & POWERS (1974).

Le tableau suivant en donne l'essentiel.

PROPRIETES	C_4	C_5
*		
K_m , benzoylcholine -----	7,7	14,8
K_i , dibucaïne -----	0,34	0,44
K_i , fluorure -----	14	42
K_i , procaïne -----	3,4	5,3
K_i , benzoylcholine -----	100	60
[I] 1/2, ACh -----	5,0	3,5
[I] 1/2, succinylcholine-----	90	85
Activité comparée à la benzoylcho- line (unités arbitraires)		
α -naphylbutyrate -----	0,95	0,84
BuSCh -----	1,02	1,04
Pourcentage d'activation par l'al- cool 10% (25°C) -----	60	44
Inactivation à 58°C, k (premier ordre)-----	0,38	0,25

* Les valeurs des constantes sont données en μM .

Comme l'indique le tableau précédent, les propriétés des deux formes tétramériques semblent voisines bien que C_5 soit moins inhibée que C_4 par le fluorure, mais soit plus sensible que cette dernière aux excès de substrat ou aux autres inhibiteurs. La principale différence entre les deux enzymes tient à la charge électrique responsable des différences de mobilité électrophorétique. L'action de la neuraminidase révèle que C_5 est moins riche en NANA que C_4 . Il semble que C_5 soit un tétramère analogue à C_4 , mais hybride entre des sous-unités normales (usuelles) et des sous-unités enzymatiques différentes, synthétisées sous la dépendance du gène E_2 .

4.5. Les autres variants .

En 1966, NEITLICH découvre un autre variant dont le locus, dit *cynthiana*, n'est pas encore établi. Ce variant augmente l'activité de l'enzyme de trois fois, résiste au Suxaméthonium et présente une mobilité électrophorétique très faible. On connaît encore d'autres variants : le variant "chlorure" résistant au n-butanol, mis en évidence par WHITTAKER en 1968 et le variant de GLADKIKH (1971) qui, bien que sa mobilité soit plus faible, semble très proche sinon identique, au variant C_5^+ .

Il est intéressant d'observer que les variants codés par des gènes situés sur des autres loci que E_1 ont des propriétés moléculaires en apparence plus différenciées que les allèles de E_1 ; on peut, en particulier, les caractériser par leur mobilité électrophorétique. Cependant, dans une publication récente, MASCALL & EVANS (1977) ont réussi à séparer les variants "fluorure" et "silencieux" par électrophorèse bidimensionnelle en gradient de polyacrylamide. Les différences qui existent entre les variants allélomorphes sont donc, peut-être, plus étendues qu'on ne l'imaginait jusqu'à présent.

PROPRIETES DIFFERENTIELLES ET FREQUENCES DES VARIANTS

d'après les données de MONE & MATHIE (1967); KARCZMAR (1970, p. 82); LA MOTTA & WORONICK (1971).

Génotypes	Phénotypes	Activité (%) (BzCh)	Nombre de dibucaïne	Nombre de fluorure	Fréquence (%)
$E_1^u E_1^u$	UU	100	80	64	96
$E_1^u E_1^a$	UA	78	60	48	3-4*
$E_1^a E_1^a$	AA	25	20	23	0,035
$E_1^a E_1^f$	AF	60	50	30	0,25**
$E_1^u E_1^f$	UF	80	76	52	0,50 - 1 ?
$E_1^f E_1^f$	FF	50	67	34	très rare
$E_1^f E_1^s$	FS	61	67	43	très rare
$E_1^u E_1^s$	US	65	80	64	0,5
$E_1^a E_1^s$	AS	20	20	23	0,012
$E_1^s E_1^s$	SS	0	-	-	0,001
$E_2^- E_2^-$	C_5^-	100	***	***	***
$E_2^- E_2^+$	C_5^+	130	***	***	***
$E_2^+ E_2^+$	C_5^+	130	80	64	8-10

* 0, 25 % chez les Noirs (GARRY, 1971).

** Population des étudiants britanniques (WHITTAKER & SPENCER, 1977).

*** Correspond à l'activité du locus E_1 .

MATERIELS & METHODES

CHAPITRE I

PRINCIPES METHODOLOGIQUES

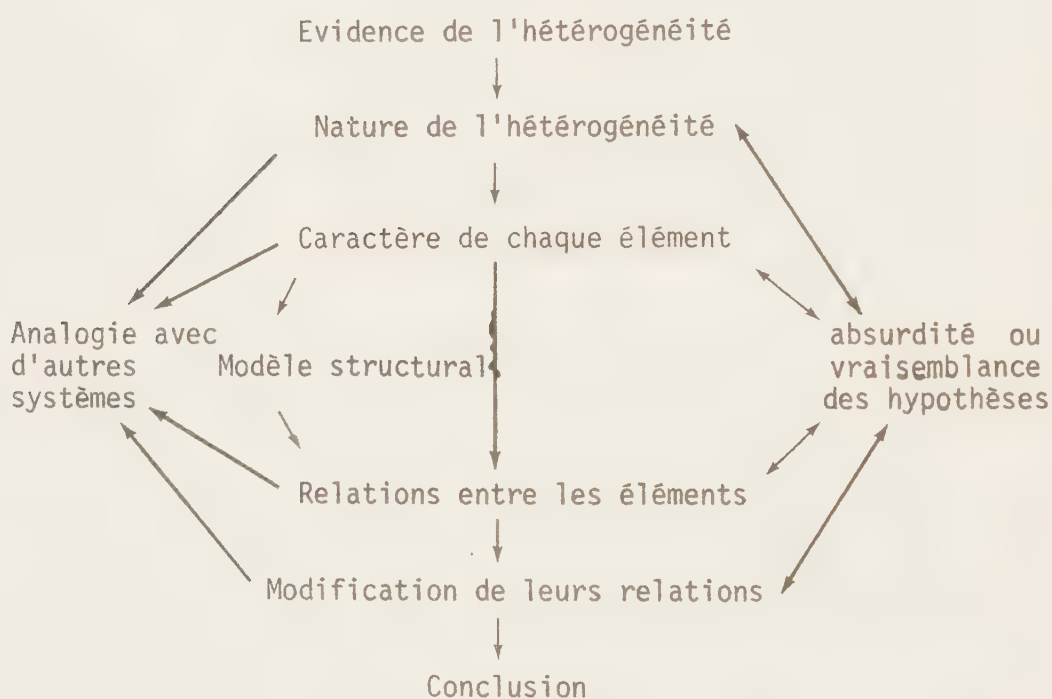
Il est maintenant établi que les formes multiples de la Butyrylcholinestérase du sérum humain diffèrent principalement par leur taille et que l'enzyme majoritaire est tétramérique. Notre objectif a été de définir la structure des formes intermédiaires, les relations qui existent entre elles, ainsi que la nature des liaisons qui déterminent l'association des sous-unités.

Notre problématique a été rendue possible par la conjonction thorique de trois éléments :

- l'utilisation très large de raisonnements hypothético-déductifs, analogiques et par l'absurde;
- ce premier élément déterminant le second, c'est-à-dire l'appel à l'expérience;
- enfin, la quantification par le traitement mathématique de l'expérience, nécessairement limitée en raison de l'utilisation d'un ensemble de techniques restreint et fortement imprégné de relativisme.

La plupart des résultats numériques ont été assortis d'un intervalle de confiance à 95 % ($\alpha = 0,05$). Mais le nombre de déterminations N étant, en général, inférieur à 30, nous étions placé dans la situation des petits échantillons et avons dû admettre que les caractères quantitatifs étudiés étaient distribués selon une loi normale.

Le cheminement que nous avons suivi peut être représenté par le schéma suivant.



CHAPITRE II

SOURCE DE L'ENZYME

L'étude des différentes formes de la BuChE a été réalisée sur des sérums ou des plasmas humains frais.

Les sérums étaient prélevés sur tubes secs , et les plasmas sur tubes héparinés, chez des individus de sexe masculin, volontaires ou se présentant à l'occasion d'exams médicaux annuels systématiques, âgés de 20 à 40 ans, ne portant aucune affection pouvant modifier la synthèse ou l'activité de l'enzyme, ne prenant aucun médicament (on sait en particulier que la Phénelzine et le Clofibrate dépriment l'activité de la BuChE), et pourvus de l'enzyme normale (absence de variants).

Immédiatement après chaque prélèvement, les échantillons étaient centrifugés, conservés à + 4°C et utilisés dans les huit jours suivants.

Dans le but de déceler et d'étudier d'éventuelles variations individuelles, les sérums n'ont jamais été réunis en pool, mais toujours traités séparément.

CHAPITRE III

MESURE DE L'ACTIVITE

Pour suivre les modifications ou la répartition des différentes formes de l'enzyme au cours de certains traitements du sérum ou au cours de processus de fractionnement, nous avons été amené à mesurer son activité totale dans le sérum ou dans les diverses fractions recueillies.

Lorsque nous nous sommes adressé au sérum entier nous avons utilisé une technique électrométrique au pH-stat mise au point dans notre laboratoire par DESIRE et al. (1973). Lors de fractionnements, compte tenu du pouvoir tampon et du grand nombre d'échantillons, nous avons dû faire appel à une autre technique et adopter la méthode d'ELLMAN (1961), simple à mettre en oeuvre, fiable et très largement utilisée.

Bien que ces deux techniques n'utilisent pas les mêmes substrats, les résultats qu'elles fournissent sont strictement comparables.

1. MESURES AU pH-STAT .

1.1. Principe.

L'hydrolyse du substrat libérant de l'acide acétique, on suit la réaction enzymatique en maintenant constant le pH par un apport continu de soude qui neutralise les ions H^+ au fur et à mesure de leur libération dans le milieu.

Cette technique, très fine, est de mise en oeuvre délicate. Il est nécessaire d'opérer sous atmosphère d'azote pour éviter la carbonatation de la soude et toute la verrerie doit être préalablement siliconée.

1.2. Matériel.

Les vitesses de réaction sont mesurées à l'aide d'un ensemble titrateur METTLER constitué d'une cellule de 50 ml, thermostatée à $25 \pm 0,1^\circ C$ et munie d'une électrode de verre combinée INGOLD, d'une autoburette DV 11 équipée du système automatique d'écoulement DV 13, d'un système d'amplification du potentiel d'électrode DK 14, d'une unité de contrôle du pH et de la vitesse d'hydrolyse DK 11, à laquelle est adjoint un analyseur d'ions millivoltmètre numérique ORION 601 A pour le contrôle permanent du pH.

L'enregistrement des courbes s'effectue sur une table enregistreuse TARKAN 600.

1.3. Réactifs.

Toutes les solutions préparées à partir d'eau bidistillée décarbonatée sont stockées en récipients clos, dans lesquels barbotte un courant d'azote exempt d'anhydride carbonique.

- . Soude : 0,01 M
- . Acide chlorhydrique: 0,1 M
- . Chlorure de sodium (Merck "Suprapur"): 0,155 M
- . Acétylcholine (Fluka "purum") : 0,25 M en solution dans l'eau et conservée au maximum 48 h à $+ 4^\circ C$.

1.4. Mode opératoire.

On introduit dans la cuve contenant déjà 50 ml de NaCl 0,155 M et équilibrée à la température de travail, 250 μ l de sérum; on ajuste le pH à 7,40 par adjonction de quelques microlitres d'HCl 0,1 M, puis après vérification de l'absence de dérive acide, 200 μ l de substrat sont, à leur tour, injectés dans le milieu réactionnel. La concentration finale d'acétylcholine est alors de 10^{-3} M.

Le pH est maintenu constant à $7,4 \pm 0,1$ par addition continue de NaOH 10^{-2} .

Le tracé des tangentes aux courbes d'hydrolyse permet de déterminer les vitesses initiales et l'activité en micromoles d'acétylcholine hydrolysées par minute et par millilitre. Sachant que l'intervalle entre deux lignes du papier correspond à 2 μ l de NaOH 10^{-2} M, soit $2 \cdot 10^{-2}$ μ M, et que la quantité de sérum prélevée est de 1/4 ml ; pour un nombre N d'intervalles mesuré par minute, l'activité en U.I. déterminée avec une précision de 2,5 %, s'exprime par la relation :

$$\text{Act. (U.I.)} = 8 \cdot 10^{-2} \cdot N$$

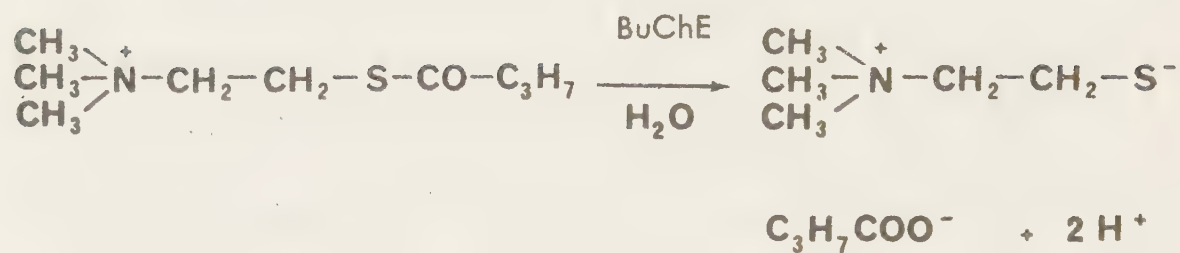
2. MESURES PAR LA METHODE D'ELLMAN.

2.1. Principe.

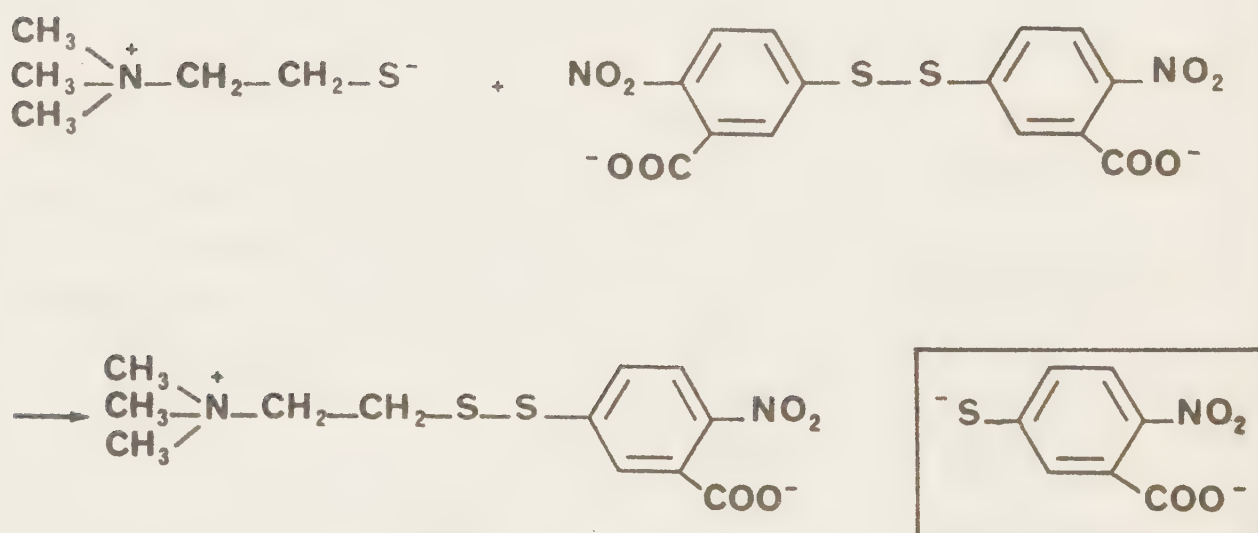
L'hydrolyse de la Butyrylthiocholine libère la thiocholine qui réagit par compétition sur une molécule chromogène, l'acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque), ou DTNB.

La réduction du pont disulfure du DTNB donne naissance à l'acide 5-thio,2-nitrobenzoïque jaune entre pH 5 et 8 et présentant un maximum d'absorption à 420 nm.

Réaction hydrolytique :



Réaction colorée :



2.2. Matériel.

Spectrophotomètre BECKMAN DK 2A avec cuves O.S. de parcours optique 10 mm.

2.3. Réactifs.

. Tampon phosphate 0,1 M pH 7

. Solution de DTNB 0,01 M

DTNB (Fluka)----- 39,6 mg

NaHCO₃ ----- 15 mg

Tampon phosphate q.s.p. 10 ml

Cette solution se conserve 4 jours maximum à + 4°C et doit être tenue à l'abri de la lumière.

. Butyrylthiocholine 0,15 M dans NaCl 9 %

Cette solution doit être conservée à l'obscurité à + 4°C et utilisée dans la journée.

2.4. Mode opératoire .

On introduit successivement dans la cuve 2,9 ml de tampon, 100 μ l de DTNB et 50 μ l du liquide contenant l'enzyme. Puis on injecte 20 μ l de substrat (concentration finale 10^{-3} M). Après une brève agitation, on déclenche le système enregistreur.

La variation d'absorbance à 420 nm pendant une minute est proportionnelle à l'activité.

On détermine celle-ci comme dans la technique précédente, en traçant la tangente à la courbe d'hydrolyse qui représente la vitesse initiale de la réaction. On tient compte du facteur de dilution (61,4) et du coefficient d'extinction molaire de l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque ($\epsilon = 1,36 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) déterminé par ELLMAN pour exprimer l'activité en unités internationales (U.I.).

$$\text{Act. (U.I.)} = \frac{\Delta A_{420}}{t} \cdot \frac{10^3}{1,36 \cdot 10^4} \cdot \frac{3,07}{0,05} = 4,51 \cdot \frac{\Delta A_{420}}{\text{min}}$$

CHAPITRE IV

MISE EN EVIDENCE DE L'HETEROGENEITE MOLECULAIRE

L'hétérogénéité moléculaire de la BuChE a été étudiée au moyen de l'électrophorèse annulaire en gel de polyacrylamide et de la chromatographie d'exclusion. La première méthode permet de séparer les protéines en fonction de leur charge électrique et de leur encombrement moléculaire, la seconde ne prend en compte que la taille des molécules.

1. TECHNIQUE D'ELECTROPHORESE ANNULAIRE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE.

1.1. Introduction.

Parmi les techniques qui ont été mises en oeuvre tout au long de ce travail, c'est certainement l'électrophorèse annulaire en gel de polyacrylamide qui a été la plus largement utilisée pour des raisons que son seul succès et son universalité pourraient suffire à justifier.

En réalité, c'est surtout l'extrême finesse de cette technique, ses immenses possibilités et son faible coût qui nous l'on fait adopter dès les premiers mois de nos recherches.

Le protocole opératoire que nous avons suivi et auquel nous nous référerons tout au long des chapitres à venir est inspiré de celui de JUUL (1968). Nous y avons cependant apporté quelques modifications notables, surtout en ce qui concerne la composition du gel de séparation, en portant le rapport N,N'-méthylène-bis-acrylamide/acrylamide à 1/28, et en opérant en général à une concentration en gel T = 8 %, ceci afin de diminuer les temps de migration tout en augmentant le pouvoir de résolution.

Pour ce qui concerne la révélation des zones d'activité cholinestérasique, nous sommes restés fidèle à la méthode de KOELLE & FRIEDENWALD, modifiée par JUUL (1968) mais, dans certaines circonstances, nous avons été conduit à nous servir de la technique fluorimétrique de GUILBAULT et al. (1970).

1.2. Technique électrophorétique.

1.2.1. Matériel.

Pour nos électrophorèses, nous avons utilisé deux types de cuves analytiques, chacune pouvant recevoir huit tubes . La première a été la cuve SHANDON, la seconde inspirée du schéma de CHRAMBACH & RODBARD (1971) nous a été réalisée par les ateliers de la Pharmacie Centrale des Armées (ORLEANS). Cette seconde cuve présente l'avantage sur la première de posséder un système d'autore-froidissement des tubes par le tampon du bac anodique.

Les tubes de migration PRECIBOR de 74 mm X 5 mm Ø intérieur ont été remplis de gel de séparation sur une hauteur de 60 mm, de gel de concentration sur 10 mm et enfin de gel de dépôt (50 μ l) sur 2 mm.

Pour la photopolymérisation des deux derniers gels, nous avons confectionné une rampe de 2 tubes de 6 W type "Lumière du jour" munie d'un réflecteur en aluminium.

Enfin, pour l'alimentation, nous avons choisi le générateur de courant LKB 2103.

1.2.2. Réactifs .

La concentration en monomères des trois gels superposés qui constituent le support a été calculée par la relation:

$$T = \frac{A + B}{V} \times 100$$

A : Concentration d'acrylamide

B : Concentration de BIS

V : Volume de tampon

et le taux de réticulation C évalué par la relation :

$$C = \frac{B}{A + B} \times 100$$

Gels	T %	C %	Tampon	pH
Gel de dépôt	3,75	6,66	TRIS : 0,0569 M HCl : 0,063 M	5,8
Gel de concentration	3,75	6,66	TRIS : 0,0569 M HCl : 0,063 M	5,8
Gel de séparation	8	3,44	TRIS : 0,309 M HCl : 0,063 M	8,7

1.2.2.1. Solutions pour le gel de séparation

. Solution Acrylamide/Bis

- Acrylamide (Fluka) -----	23,172 g
- Bis (Fluka) -----	0,827 g
- Eau distillée q.s.p. -----	100 ml

. Solution tampon-TEMED

- TRIS (Prolabo) -----	11,25 g
- HCl N (Titrisol-Merck) -----	18,9 ml
- TEMED (Fluka) -----	0,09 ml
- Saccharose (Merck) -----	30 g
- Eau distillée q.s.p. -----	100 ml

. Solution de persulfate d'ammonium

- Persulfate d'ammonium (Prolabo) ----- 0,225 g
- Eau distillée q.s.p. ----- 100 ml

1.2.2.2. Solutions pour le gel de concentration

. Solution Acrylamide/Bis

- Acrylamide ----- 7 g
- Bis ----- 0,50 g
- Saccharose ----- 40 g
- Eau distillée q.s.p. ----- 100 ml

. Solution Tampon-catalyseur

- TRIS ----- 1,38 g
- HCl N ----- 12,6 ml
- TEMED ----- 0,126 ml
- Riboflavine (Fluka) ----- 2 mg
- Eau distillée q.s.p. ----- 100 ml

1.2.2.3. Solutions pour le gel de dépôt

Ce sont les mêmes que pour le gel de concentration.

1.2.2.4. Tampon circulant pH 8,4: $\mu=0,0225$

- TRIS ----- 5 g (0,041 M)
- Glycocolle (Merck) ----- 40 g (0,533 M)
- Eau distillée q.s.p. ----- 1000 ml

Ce tampon est utilisé pur dans le compartiment cathodique et dilué au 1/10 dans le bac anodique.

1.2.2.5. Colorant traceur indicateur du front de migration

Bleu de Bromophénol à 0,01 %

Toutes ces solutions sont conservées à + 4°C pendant plusieurs semaines, à l'abri de la lumière, sauf la solution de persulfate qui doit être re préparée chaque semaine.

Avant utilisation, elles doivent être dégazées pendant 10 minutes et amenées à la température du laboratoire avant la polymérisation.

1.2.3. Préparation des gels.

1.2.3.1. Préparation du gel de séparation

Les trois solutions génératrices de ce gel sont mélangées à parties égales, puis cette solution gélifiante est versée dans chaque tube sur une hauteur de 60 mm. On recouvre ensuite de 5 mm d'eau, afin que la surface du gel soit parfaitement plane. La polymérisation chimique initiée par le persulfate et le TEMED s'accomplit en 60 minutes.

1.2.3.2. Préparation du gel de concentration

Les deux solutions formant ce gel sont mélangées à parties égales. La couche d'eau qui recouvre le gel précédent est éliminée; on rince la partie supérieure de chaque tube avec ce mélange gélifiant, puis on le verse sur une hauteur de 10 mm au dessus du gel de séparation. On recouvre encore de 5 mm d'eau.

La photopolymérisation initiée par la riboflavine, le TEMED et la lumière se déroule ensuite en 30 minutes, les tubes étant placés à 5 cm de la rampe.

1.2.3.3. Dépôt de l'échantillon

La couche d'eau qui recouvre le gel de concentration est éliminée; on rince avec la solution gélifiante précédente, puis on introduit les 50 μ l de solution gélifiante contenant l'échantillon : 5 μ l de sérum ont été dilués au 1/10 afin de se trouver dans les conditions optimales de migration et de dé-

tection représentées par une concentration en protéines de l'ordre de 200 à 300 μ g.

La photopolymérisation est réalisée dans les mêmes conditions que pour le gel précédent.

Les gels ainsi préparés peuvent être conservés environ 24 h, à 4°C. Au-delà, les discontinuités de pH entre les gels s'estompent et il en résulte une diminution de la résolution.

1.2.4. Electrophorèse.

1.2.4.1. Conditions opératoires

Lorsque la dernière polymérisation est achevée, l'électrophorèse peut être lancée.

L'opération se déroule au réfrigérateur à $10 \pm 2^\circ\text{C}$, avec une intensité constante de 3 mA/tube.

Le BBPh incorporé au tampon du bac cathodique se déplace à la même vitesse que les ions du tampon circulant et marque ainsi le front de migration qui atteint l'extrémité inférieure des gels au bout de 60 minutes environ. Le colorant se lie également aux protéines mais, seule, l'albumine apparaît nettement.

1.2.4.2. Décollement des gels après l'électrophorèse

On introduit une aiguille entre le gel et la paroi du tube et l'on injecte de l'eau distillée tout en effectuant un mouvement de rotation. Les gels glissent facilement hors des tubes si ceux-ci sont, au préalable, très propres.

1.2.4.3. Nettoyage des tubes

Afin d'éliminer les fragments de gels restés éventuellement collés sur la paroi interne, les tubes sont im-

mergés pendant 48 heures dans de l'eau oxygénée à 110 volumes.
Cette solution dépolymérise le polyacrylamide.

1.2.5. Coloration des protéines.

1.2.5.1. Noir Amido 10 B

Les gels, après démoulage, sont immergés pendant 30 minutes dans une solution de Noir Amido 10 B (Merck) à 1 % dans l'acide acétique à 7 %. Cette solution conservée en flacon de verre teinté doit être filtrée avant utilisation.

L'excès de colorant est éliminé en 48 heures environ par lavages successifs dans les bains d'acide acétique à 7 %, renouvelés fréquemment.

Les gels ainsi colorés peuvent être conservé indéfiniment dans l'acide acétique à 7 % .

1.2.5.2. Bleu de Coomasie R 250

La sensibilité du Bleu de Coomasie, supérieure à celle du Noir Amido, nous a souvent fait préférer ce colorant, en particulier, pour la coloration des protéines étalons, lors des déterminations de masses moléculaires par la méthode d'HEDRICK & SMITH (1968) et obligatoirement après électrophorèse en présence de S.D.S. (WEBER et al., 1972).

. Solution de Bleu de Coomasie selon WEBER

- Bleu de Coomasie R 250 (Merck) -- 1,25 g
- Méthanol ----- 227 ml
- Acide acétique ----- 46 ml
- Eau distillée q.s.p. ----- 500 ml

Cette solution, conservée en flacon de verre jaune, doit être filtrée avant l'emploi.

. Solution de décoloration

- Méthanol ----- 50 ml
- Acide acétique ----- 75 ml
- Eau distillée q.s.p. -----1000 ml

Comme avec le Noir amido, la coloration s'accompagne de la fixation des protéines, mais il est nécessaire de laisser séjourner les gels pendant 2 heures dans la solution de Bleu de Coomasie.

L'élimination de l'excès de colorant est réalisée par diffusion dans des bains de la solution de décoloration. Cette opération dure environ 24 heures. On peut l'accélérer ou, du moins, diminuer la fréquence de renouvellement des bains de décoloration, en mettant en suspension dans le milieu, une résine échangeuse de cations (DOWEX 50 W X 2, 50-100 mesh, Fluka) qui capte le colorant.

Les gels sont conservés dans l'acide acétique à 7 % .

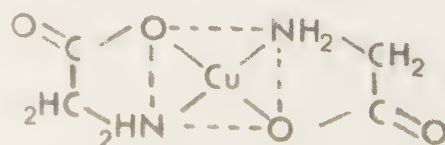
1.2.6. Détection des zones d'activité cholinestérasique.

1.2.6.1. Application de la méthode de KOELLE & FRIENDENWALD modifiée par JUUL (1968)

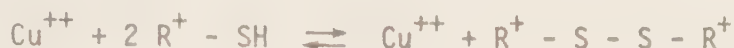
Nous avons choisi cette méthode en raison de sa sensibilité, sa finesse, sa reproductibilité et de la possibilité de quantification des résultats par densitométrie des gels.

- Principe

Après saturation des gels par un tampon contenant des ions cuivriques chélatés avec du glycolle afin de limiter leur effet inhibiteur sur l'enzyme, le substrat, la butyrylthiocholine, est ajouté.



Le mécanisme de formation et la nature du complexe de thiocholine-cuivre sont encore mal connus. Selon TSUJI (1974), la réaction nécessiterait deux étapes. Dans la première, il y aurait réduction de Cu^{++} par la thiocholine ($\text{R}^+ - \text{SH}$).



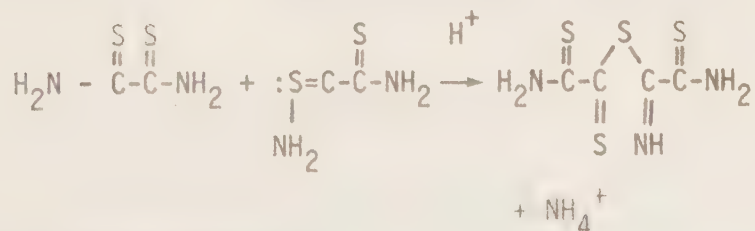
La deuxième étape serait celle de la formation du complexe blanc entre la thiocholine restante et Cu^+ formé précédemment.



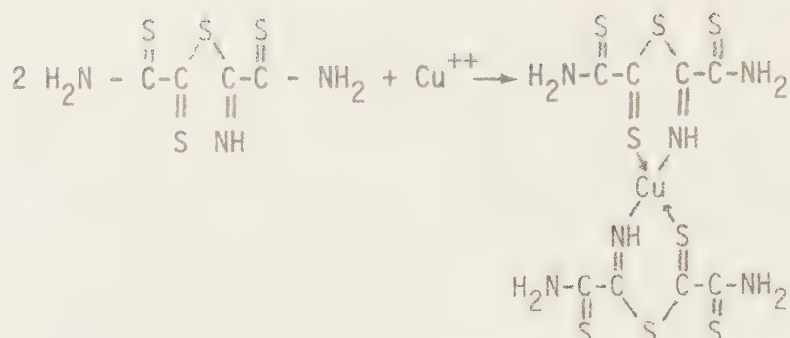
Cette réaction n'est seulement possible qu'avec un substrat sous forme d'iodure.

La révélation des zones est sensibilisée par la formation d'un nouveau complexe entre le cuivre et l'acide rubéanique (dithiooxamide) après avoir éliminé l'excès d'ions cuivriques par deshydratation des gels au moyen du sulfate d'ammonium 3 M.

L'acide rubéanique, ligand des métaux de transition, déplace le cuivre de sa combinaison avec la thiocholine, et donne un complexe insoluble de couleur verte avec ce métal. La nature et la stoechiométrie exacte de ce complexe sont encore sujettes à discussions. WILLIAMS & BOLTZ (1975) pensent que, dans un premier temps, deux molécules de dithiooxamide s'associent,



et que, dans une seconde étape, deux ou plusieurs de ces molécules complexent le cuivre.



Les gels sont ensuite réhydratés par transfert dans l'acide acétique à 7 % (pH = 2,35). Les distances de migration et l'intensité relative de chaque bande peuvent être mesurées.

- Réactifs

. Tampon phosphate (KH_2PO_4 / Na_2HPO_4 , 2 H_2O)
0,067 M; pH = 6,2; μ = 0,09.

. Solution cuivrique de préincubation

- Glycocolle ----- 0,750 g (10^{-2}M)
- Sulfate de cuivre ----- 0,500 g ($2 \cdot 10^{-3}\text{M}$)
- Sulfate de sodium ----- 4,260 g ($3 \cdot 10^{-2}\text{M}$)
- Tampon phosphate q.s.p. ----- 1000 ml

. Solution d'incubation

Cette solution est préparée extemporanément par dissolution du substrat, BuSch à $3,2 \cdot 10^{-3}\text{M}$, dans la solution cuivrique de préincubation; soit 102 mg d'iodure de butyrylthiocholine (Merck ou Fluka) pour 100 ml .

. Sulfate d'ammonium 3M (396 g/1000 ml)

. Solution d'acide rubéanique

Solution de dithiooxamide (Merck à saturation dans le sulfate d'ammonium 3M).

. Acide acétique à 7 %

- Mode opératoire

Les gels, après leur démoulage, sont immergés pendant 30 minutes à 20°C dans la solution cuivrique de préincubation. Les tubes sont fréquemment retournés afin de faciliter la diffusion de cette solution dans le gel.

Cette première phase terminée, les gels sont transférés pendant 90 minutes, toujours à la même température, dans la solution d'incubation. Les zones de précipité blanc de thiocholine-cuivre commencent à apparaître après une dizaine de minutes d'incubation.

L'excès d'ions cuivriques est éliminé par passage sur sulfate d'ammonium 3M, 24 heures, à + 4°C.

Enfin, les bandes sont révélées après immersion 24 heures, à + 4°C, dans la solution d'acide rubéanique.

Les gels rétractés sont enfin réhydratés après leur transfert dans l'acide acétique à 7 % et l'on peut procéder à la mesure des mobilités relatives par rapport au BBPh et à la densitométrie sur appareils A*ELAB D.1.4. ou GELMAN DC16 positionnés sur le filtre rouge.

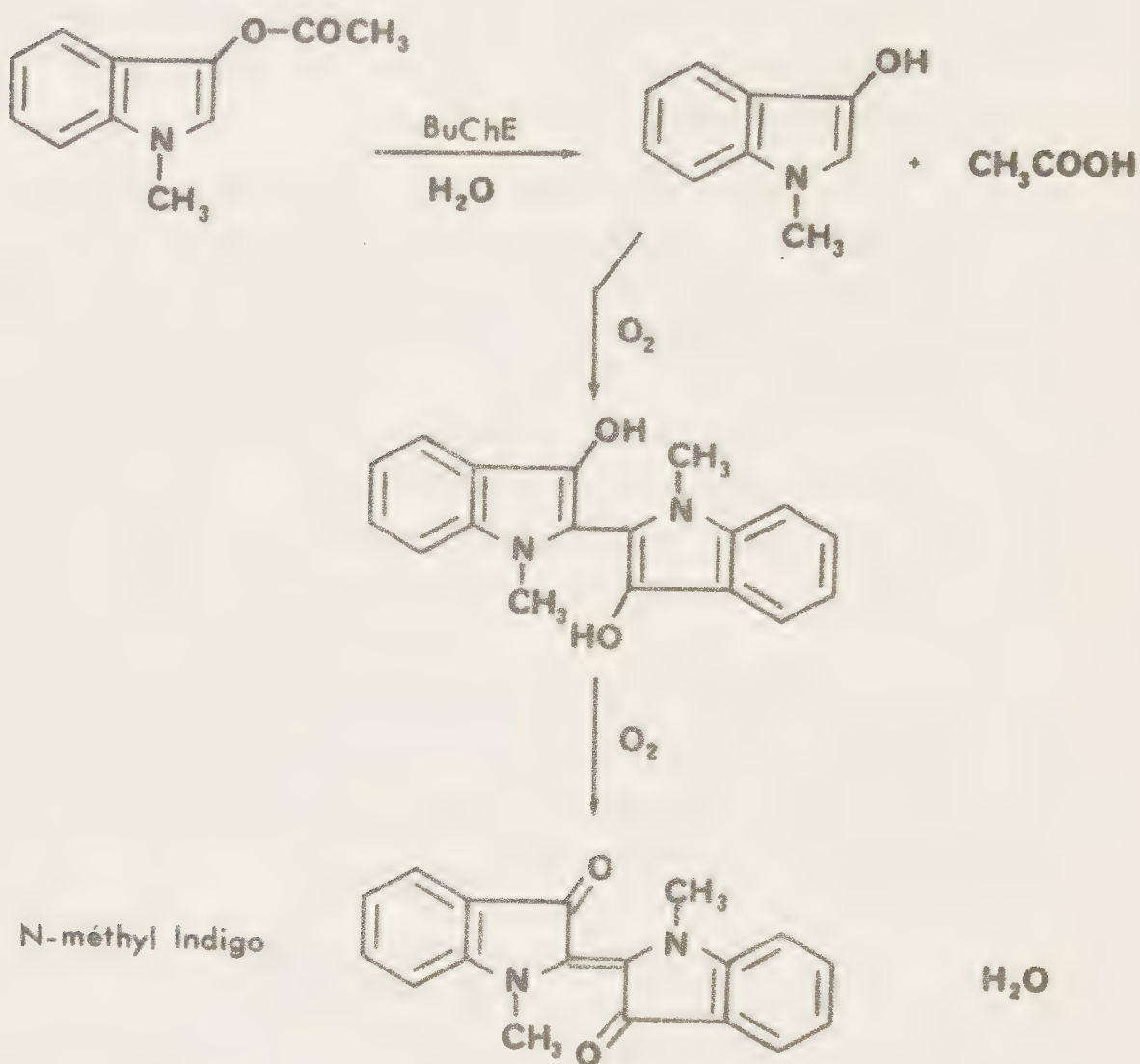
1.2.6.2. Application de la technique de Guilbault

Nous avons fait appel à cette technique chaque fois que la présence d'un mercaptan dans le milieu réagissant avec les ions cuivriques interdisait l'emploi de la méthode de JUUL.

- Principe

Parmi les substrats fluorogènes, l'acétate de N-méthyl indol (NMIA) est apparu comme un des plus sensibles pour la détermination des cholinestérases après électrophorèse sur gel de polyacrylamide. La BuChE l'hydrolyse rapidement et le N-méthyl indol libéré présente une intense fluorescence verte ($\lambda_{ex} = 430$ nm et $\lambda_{em} = 510$ nm). Par oxydation sous l'influence de l'oxygène dissous, ce composé se condense avec lui-même et donne, dans un

premier temps, du vert de N-méthyl indol, puis du N-méthyl indigo qui précipite in situ.



- Réactifs

- . Tampon phosphate 0,1 M, pH 7,5
- . Tampon phosphate 0,1 M, pH 7
- . Acétate de N-méthyl indol (Isolab, distribué par EURO-BIO, PARIS) à 0,26 M, dans le 2-méthoxy éthanol (Fluka): 50 mg/ml.
- . Solution d'incubation à $5,28 \cdot 10^{-3}$ M en substrat.
- Tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 ----- 2,5 ml
- Solution stock de NMIA ----- 0,1 ml
- Eau distillée ----- 2,4 ml

- Mode opératoire

Les gels sont introduits dans les tubes contenant la solution incubatrice et placés au bain-marie à 37°C. En moins de 5 minutes, au niveau des zones d'activité cholinestérasique, apparaissent des disques verts intensément fluorescents en lumière de WOOD.

Après passage dans l'eau distillée pendant 10 minutes, les gels sont transférés dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7 où ils peuvent être conservés pendant quelques jours sans modification de coloration.

N.B. : Si l'on prolonge le temps d'incubation et que l'on se place à 20°C pour limiter l'hydrolyse spontanée du substrat qui forme un écran vert pâle, les arylestérases situées au niveau de l'albumine finissent par hydrolyser le NMIA au bout de plusieurs heures.

1.2.7. Détection de l'activité des estérases.

Nous avons révélé les zones d'activité estérasique (cholinestérase et arylestérase) par la réaction colorée produite entre un sel de diazonium, le Fast Blue RR Salt et l' α -naphtol libéré par l'hydrolyse de l'acétate d' α -naphtyl.

1.2.7.1. Réactifs

. α -naphtyl acétate (Eastman) en solution à $2,7 \cdot 10^{-2}$ M dans le méthanol (5 mg/ml).

. Fast Blue RR Salt (Sigma) à 10 mg/ml de méthanol.

. Tampon phosphate 0,067 M pH 6,2

1.2.7.2. Mode opératoire

On introduit chaque boudin de gel dans 5 ml de tampon contenant 100 μ l de substrat et 100 μ l de Fast Blue RR Salt. Après 15 minutes d'incubation au B.M. à 37°C, les zones d'activité

estérasique apparaissent en rose.

2. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION .

Bien que HARRIS & ROBSON (1963) aient montré, par filtration sur gel de Sephadex G-200, que les formes de la BuChE du sérum humain présentent d'importantes différences de taille, il nous a semblé indispensable de confirmer par cette technique les résultats obtenus par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

En effet, plusieurs auteurs ont observé, avec certaines protéines, la formation d'artéfacts lors de l'électrophorèse. Dans certains cas, le persulfate pourrait provoquer des oxydations; la riboflavine, lors du processus de photopolymérisation pourrait être à l'origine de variation de l'état d'agrégation de protéines oligomériques (MAURER, 1971, pp. 59-60); enfin, HIEBER et al. (1972) ont montré que l'interaction de certaines protéines avec le BBPh peut engendrer des formes multiples.

2.1. Matériel et réactifs pour la chromatographie.

Nous avons fractionné les protéines du sérum en chambre froide, sur une colonne Pharmacia K-26 chargée de Sephadex G-200. Pour l'élution, nous avons utilisé un tampon phosphate 0,01 pH 7,4 (+ azide de sodium, agent bactériostatique) injecté à l'aide d'une pompe péristaltique LKB Varioperpex. Les fractions ont été recueillies dans le collecteur LKB Ultro-Rac 7000 avec unité de programmation et contrôle séparée.

2.2. Mode opératoire.

Le sérum est préalablement dessalé sur une petite colonne de Sephadex G-10.

La colonne K-26 est remplie sur une hauteur de 85 cm et après équilibrage à +4°C, on injecte par le bas 3 ml de sérum à 1'

aide de la pompe.

L'élution des protéines se fait avec un débit de tampon de 15ml/h. Des fractions de 5 ml sont recueillies dans chaque tube.

2.3. Dosage des protéines collectées .

Les protéines ont été dosées sur un autoanalyseur Technicon, à l'aide de la technique de CASTAIGNE et al. (1965) basée sur la méthode de LOWRY et al. (1951).

Sous l'action d'une solution cupro-alkaline et du réactif phosphomolybdotungstique de FOLIN-CIOCALTEU, il se développe une coloration bleu foncé, résultant de l'action des ions cuivriques sur les liaisons peptidiques (réaction du biuret) et de la réduction du réactif de FOLIN-CIOCALTEU par la tyrosine et les aminoacides réducteurs.

2.3.1. Réactifs.

. Solution cuprique

- Sulfate de cuivre , 5 H₂O ----- 1 g
- Tartrate neutre de sodium ----- 2 g
- Eau distillée q.s.p. ----- 1000 ml

Cette solution se conserve une semaine à + 4°C.

. Solution alcaline

- Soude 10N (ou 16 g de soude en pastille) 40 ml
- Carbonate de sodium anhydre ----- 42,4 g
- Eau distillée q.s.p. ----- 2000 ml

. Réactif de FOLIN-CIOCALTEU (Merck)

- dilué au 1/3 extemporanément.

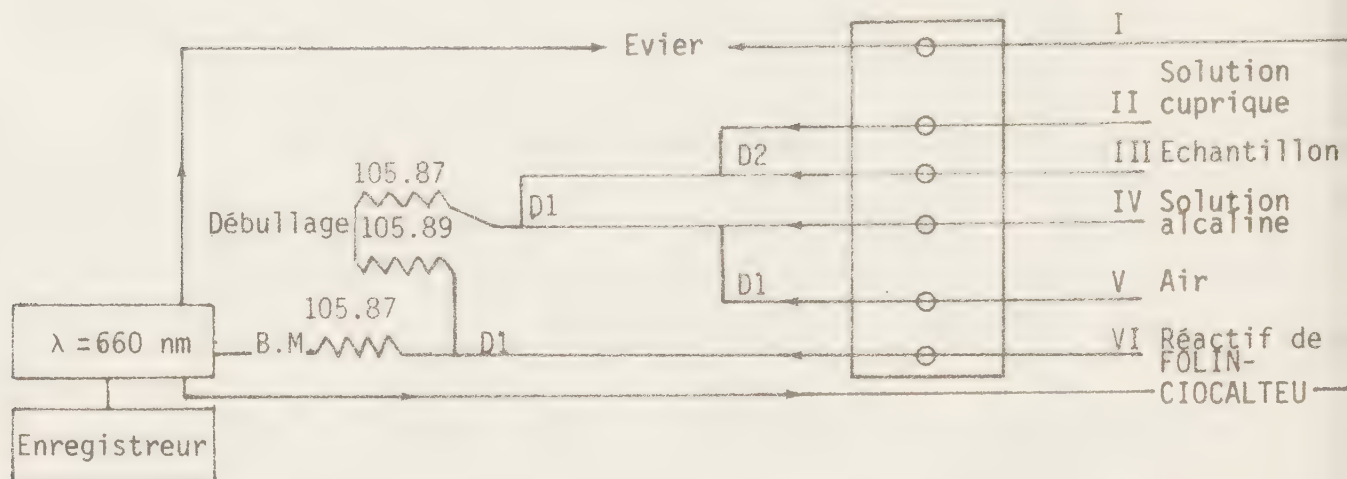
. Sérum albumine bovine (Sigma)

- Solution mère à 2,5 mg/ml dans du chlorure de sodium à 9 % .

. Solutions étalons d'albumine

On dilue la solution stock afin d'obtenir une gamme d'étalonnage de 25 à 250 µg/ml .

2.3.2. Schéma du manifold et conditions opératoires.



N° tubes de pompe	Diamètre interne	Débit ml/min
I	0,090	2,90
II	0,040	0,60
III	0,035	0,42
IV	0,090	2,90
V	0,040	0,60
VI	0,040	0,60

- Vitesse : 60 échantillons par heure .

- Le bain-marie n'est pas branché; on utilise son serpentin pour augmenter le temps de réaction.

- Filtres : 660 nm

- Longueur de la cuve : 10 mm

2.4. Détermination des pics d'activité cholinestérasique.

La mesure de l'activité cholinestérasique dans les différentes fractions a été également pratiquée sur autoanalyseur Technicon par la technique de VOSS (1968), dérivée de la méthode manuelle d'ELLMAN et al. (1961).

Cependant, pour la détermination exacte de l'activité en unités internationales, nous avons écarté le système d'étalonnage

proposé par GARRY & ROUTH (1965) et par VOSS, basés sur la réduction du DTNB par le glutathion, parce qu'il complique la technique et est à l'origine d'erreurs en autoanalyse. Il est possible de calculer l'activité de manière plus directe connaissant le coefficient d'extinction molaire de l'acide 5-thio 2-nitro benzoïque déterminé par ELLMAN : $\epsilon = 1,36.10^4 \text{ mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

L'activité peut alors s'exprimer par la formule :

$$\text{Act. (U.I.)} = \frac{A_{420}}{t(\text{min})} \cdot \frac{10^3}{\epsilon} \cdot \frac{\text{Volume total de liquide pompé}}{\text{Volume de l'échantillon}}$$

2.4.1. Réactifs.

. Tampon phosphate 0,01 M pH 7

. Tampon phosphate 0,01 M pH 8

. Solution stock de DTNB

- DTNB ----- 200 mg

- NaHCO_3 ----- 40 mg

- Tampon phosphate pH 7 ----- 100 ml

Cette solution se conserve 15 jours maximum, à l'obscurité et à + 4°C.

. Solution BuSch / DTNB

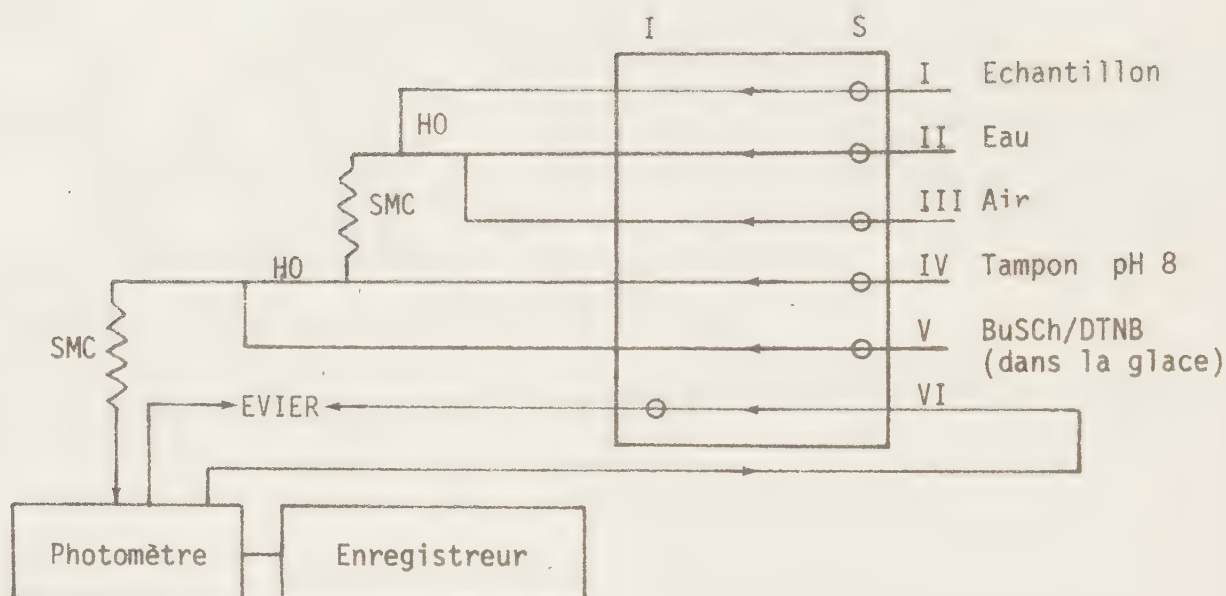
- Solution stock DTNB ----- 10 ml

- BuSch ----- 179 mg ($5,66.10^{-3}\text{M}$)

- Eau distillée q.s.p. ----- 100 ml

. Dans les tampons, on ajoute 0,5 ml de BRIJ 35 par litre.

2.4.2. Schéma du manifold et conditions opératoires.



N° tubes de pompe	Diamètre interne	Débit ml/min
I	0,045	0,80
II	0,045	0,80
III	0,045	0,80
IV	0,056	1,20
V	0,040	0,60
VI	0,081	2,50

- Vitesse : 60 échantillons par heure
- Filtre : 420 nm
- Longueur de la cuve : 15 mm

Le volume total de liquide pompé par minute est de 3,4 ml, celui du substrat étant de 0,60 ml, la concentration finale en substrat est de 10^{-3} M.

Le contact entre l'enzyme et le substrat s'effectue à la sortie du deuxième cactus H0. La longueur de la tuyauterie est calculée telle que le temps d'analyse précédant la lecture soit de 2 minutes.

L'expression qui donne l'activité en U.I. devient :

$$\text{Act.} = \frac{A_{420}}{2} \cdot \frac{10^3}{1,36 \cdot 10^4} \cdot \frac{3,4}{0,8} = 0,156 \cdot A_{420}$$

CHAPITRE V

DETERMINATION DES PARAMETRES MOLECULAIRES

Notre hypothèse de départ étant que les formes multiples de la BuChE diffèrent principalement par leur taille et constituent probablement une famille de "polymères" d'une même sous-unité, la détermination des paramètres moléculaires de ces formes : masses moléculaires, rayons de STOKES, rapports de friction, constantes de sédimentation, volumes spécifiques partiels, point isoélectrique et mobilité électrophorétique, occupe une place centrale dans notre travail.

Compte tenu de la nature de notre matériau d'étude, le sérum, et de difficultés que nous avons déjà évoquées, nous avons dû choisir et adapter nos techniques en fonction de celles-ci. Avec un investissement réduit offrant la possibilité de travailler sur un substratum impur, les différentes techniques d'électrophorèse en gel de polyacrylamide et l'ultracentrifugation de zone nous ont fourni de précieux renseignements. Cependant le caractère relativiste des résultats que nous avons obtenus ne permet leur expression qu'en terme d'apparence.

1. DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES APPARENTES DES DIFFERENTES FORMES .

Quatre méthodes ont été mises en oeuvre. Les trois premières sont des techniques électrophorétiques en gel de polyacrylamide, la quatrième fait appel à l'ultracentrifugation de zone en gradient de saccharose. Cette dernière sera étudiée au paragraphe 2 (DETERMINATION DES CONSTANTES DE SEDIMENTATION APPARENTES).

1.1. Méthode d'HEDRICK & SMITH (1968) .

1.1.1. Principe.

Les propriétés de tamis moléculaire des gels de polyacrylamide ont suggéré leur utilisation possible pour l'estimation de la masse moléculaire des protéines par électrophorèse. Cependant, en électrophorèse, la migration des protéines, si elle peut être reliée à la taille, dépend surtout de la mobilité électrophorétique dans le champ électrique, donc de la charge nette.

L'effet de la charge sur la mobilité est neutralisé si l'on opère dans des gels de concentrations (T) différentes. FERGUSON (1964) a montré, en gel d'amidon, qu'il existe une relation linéaire entre le logarithme de la mobilité et la concentration du gel (RODBARD & CHRAMBACH, 1971).

$$\log m = \log m_0 - K_R \cdot T$$

HEDRICK & SMITH (1968) ont ensuite découvert une relation linéaire empirique entre K_R , le coefficient de retardement, et la masse moléculaire M.

$$K_R = kM + a$$

dans laquelle k est une constante liée au coefficient de réticulation des gels.

Ces deux équations conduisent à une nouvelle expression de la mobilité :

$$\log m = \log m_0 - (kM + a) T$$

Cette équation décrit la mobilité d'une protéine globulaire de mobilité libre m_0 dans un gel de concentration T .

Ainsi pour deux concentrations de gels différentes T_1 et T_2 on aura :

$$\log m_1 = \log m_0 - (kM + a) T_1$$

$$\log m_2 = \log m_0 - (kM + a) T_2$$

La mobilité libre (m_0) qui ne dépend que de la charge q et du coefficient de friction de la protéine,

$$m_0 = \frac{q}{f}$$

peut être annulée en formant le rapport des mobilités m_1 et m_2 aux deux concentrations différentes ($T_2 > T_1$)

$$\log \frac{m_1}{m_2} = (kM + a) \cdot \Delta T$$

La technique d'HEDRICK & SMITH est donc basée sur la mesure des mobilités relatives (R_m) dans des gels de concentrations différentes.

Dans un gel de concentration donnée R_m est définie comme le rapport entre la distance de migration de la protéine et la distance de migration des ions de conduite marquée au BBPh.

$$R_m = \left[\frac{x_p}{x_{BBPh}} \right] T$$

et

$$\log R_m = \log R_{m0} - K_R T$$

On pratique donc des séries d'électrophorèses dans des gels de concentrations T croissantes mais de réticulation constante, et pour chaque protéine on trace les droites des fonctions $\log (R_m \times 100) = f(T)$. La pente de ces droites représente le K_R . En reportant les valeurs des coefficients de retardement sur une droite d'étalonnage $K_R = f(M)$ déterminée à l'aide de protéines étalons de masses moléculaires connues, on obtient la valeur de la masse moléculaire de la protéine inconnue.

1.1.2. Matériel.

Le matériel utilisé est le même que pour l'étude de l'hétérogénéité par électrophorèse annulaire en gel de polyacrylamide.

1.1.3. Réactifs.

Les solutions nécessaires à l'électrophorèse à la révélation des protéines et à la détection de l'activité cholinestérasique sont également les mêmes, sauf que l'on a fabriqué en plus 7 solutions d'acrylamide/BIS de rapport constant BIS/A = 1/28 pour la préparation de la galerie de gels de séparation de T = 4 % à 10 %.

T %	Acrylamide (g)	BIS (g)
4	11,586	0,413
5	14,482	0,517
6	17,379	0,620
7	20,275	0,724
8	23,172	0,827
9	26,068	0,931
10	28,965	1,034

1.1.4. Protéines étalons.

Deux systèmes d'étalonnage ont été pratiqués. Le premier avec la sérum albumine bovine (S.A.B.) et ses polymères (SCHWARZ/MANN - pour détermination des masses moléculaires), le second avec une série de protéines globulaires couvrant une échelle de masses moléculaires de 25000 à environ 480000 (SERVA, collection MS - pour chromatographie sur gel) à laquelle nous avons adjoint l'hémoglobine (KOCH-LIGHT), la transferrine humaine (étalon interne), l'uréease (WORGHTINGTON) et la tyroglobuline (SIGMA).

Toutes ces protéines ont été mises en solution à la concentration de 20 mg/ml dans du chlorure de sodium à 9 % .

1ère galerie		2ème galerie	
Protéines	M	Protéines	M
S.A.B. monomère (SCHWARZ/MANN)	67000	Chymotrypsinogène A (SERVA)	25000
Dimère	134000	Ovalbumine (SERVA)	45000
Trimère	201000	Hémoglobine (KOCH)	64500
Tétramère	268000	S.A.B. (SERVA)	67000
Pentamère	335000	Transferrine (étalon interne)	90000
Hexamère	402000	Catalase (SERVA)	250000
		Ferritine de cheval (SERVA)	480000
		Uréease (WORGHTINGTON)	480000
		Thyroglobuline (SIGMA)	669000

1.1.5. Mode opératoire.

Les conditions de l'électrophorèse et le protocole opératoire sont identiques à ceux décrits dans le chapitre précédent. Cependant, après 60 minutes de migration, lorsque le disque de BBPh arrive à quelques millimètres de l'extrémité inférieure des gels, l'électrophorèse est arrêtée. Les gels sont alors soigneusement démoulés et sectionnés à la lame de rasoir, au centre de l'anneau de BBPh, puis colorés. La mesure des distances de migration x_p et x_{BBPh} est faite après coloration ou révélation, lorsque les gels ont repris leur longueur initiale dans l'acide acétique à 7 %.

1.2. Méthode de MARGOLIS & KENRICK (1968).

1.2.1. Principe.

Dans un gel présentant un gradient continu d'acrylamide, l'effet de la taille des protéines sur la séparation devient très important. La vitesse de migration des molécules sous l'effet du champ électrique, maximale à l'entrée du gel, va progressivement se ralentir au fur et à mesure que les molécules pénètrent dans le gel. La densité du gel augmentant le diamètre des pores s'amenuise et les forces de friction deviennent de plus en plus grandes.

Lorsque la section minimale d'une espèce protéique devient supérieure au diamètre des pores du gel, la vitesse de déplacement tend vers zéro, sans pour autant s'annuler, car par effet de tunnel, la protéine écarte les fibres du gel et se fraye un passage. Cette vitesse de migration est cependant très faible et MARGOLIS & KENRICK (1968) ainsi que SKADOUN & DAUSSANT (1972) considèrent que la protéine a atteint son point final, son point "isopicnique" où elle est focalisée dans sa totalité.

En comparant la distance de migration de cette protéine avec des étalons, on peut alors obtenir une estimation de sa masse moléculaire.

LAMY et al. (1971) ont passé en revue les différentes relations théoriques qui ont été établies entre le diamètre des pores du gel (ou sa concentration) et la masse moléculaire. En fait, il existe une relation linéaire directe entre la distance de migration et le logarithme de la masse moléculaire, telle que :

$$x = a \log M + b$$

1.2.2. Matériel.

Nous avons utilisé la cuve d'électrophorèse UNISCIL UE2, un générateur de tension GELMAN HAWKSLEY et un système de réfrigération GILSON permettant de refroidir le tampon à + 4°C.

1.2.3. Réactifs.

. Plaques de gel de polyacrylamide prêtes à l'emploi GRADIPORE présentant un gradient de concentration continu de 2,5 à 28 % (distribuées par TEBU-FRANCE).

Ces plaques carrées, d'environ 72 mm X 3 mm d'épaisseur, peuvent recevoir jusqu'à douze échantillons.

. Le tampon de migration est le même que celui qu'on utilise pour l'électrophorèse annulaire (TRIS 0,041 M/Glycocolle 0,533 M, pH = 8,4).

. Les protéines étalons sont les mêmes que dans la technique d'HEDRICK à SMITH.

1.2.4. Mode opératoire.

Après vérification que le tampon circule parfaitement entre les deux bacs de la cuve et le serpentin de refroidissement et que sa température est de $+4^{\circ}\text{C}$, on fixe la plaque dans le compartiment supérieur et l'on chasse les bulles d'air emprisonnées au niveau de l'applicateur d'échantillons.

Une préélectrophorèse de 30 minutes sous une tension de 70 volts destinée à équilibrer le gel avec notre tampon est d'abord effectuée.

Puis les échantillons sont déposés dans les alvéoles de l'applicateur. Un volume de $20\ \mu\text{l}$ des solutions de protéines étalons ou du sérum dilué au 1/3 dans du tampon coloré au BBPh et saturé en saccharose représente la quantité optimale.

L'électrophorèse proprement dite est conduite sous une tension de 125 V (soit $E \simeq 17\ \text{V/cm}$) pendant 48 heures, temps jugé suffisant pour que les protéines aient atteint leur point de stabilité.

Lorsque l'opération est terminée, les gels sont sortis de leur cassette et colorés selon les procédures décrites au chapitre précédent.

La mesure des distances de migration est pratiquée sur les gels après recouvrement de leur taille initiale dans l'acide acétique à 7 %.

1.3. Méthode de MANWELL (1977)

La technique de MARGOLIS & KENRICK est certes intéressante dans son principe, mais l'estimation de la masse moléculaire à laquelle elle permet d'accéder peut être erronée. RODBARD et al. (1971) ont en effet montré, à partir de considérations théoriques, que la protéine n'atteint jamais son point d'équilibre. Dans ces conditions, toute technique basée sur l'hypothèse du point final et prétendant déterminer la masse moléculaire par référence au comportement d'une série de protéines étalons migrant dans les mêmes conditions, risque

d'être mise en défaut si les propriétés hydrodynamiques et électriques de ces protéines diffèrent de celles des protéines que l'on étudie.

C'est pourquoi MANWELL (1977) a récemment proposé une technique non plus basée sur la mesure de la distance de migration après un temps jugé suffisant pour que la protéine ait atteint son point de focalisation, mais sur l'étude de la migration, dans un gel de densité croissante, au cours du temps et il a établi une relation entre l'hypothétique taille limite des pores du gel (liée à l'inverse de la distance limite $(1/x_L)$ que la protéine atteint après un temps infini) et la racine cubique de la masse moléculaire.

1.3.2. Principe .

Selon l'équation de FERGUSON, la mobilité décroît de façon exponentielle lorsque la concentration en gel augmente :

$$m = m_0 e^{-2,3 K_R T}$$

Or, dans les gels de polyacrylamide de type GRADIPORE, la concentration en gel croît exponentiellement et compense la relation logarithmique qui existe entre la mobilité et $T\%$.

Dans ce type de gel dont le gradient est de forme concave, on peut relier la mobilité électrophorétique à l'hypothétique distance limite de migration x_L et à la distance de gel déjà traversée x , par l'équation :

$$\frac{dx}{dt} = k (x_L - x)$$

qui traduit la diminution de la vitesse de migration lorsque x tend vers x_L . Avec, pour conditions initiales, $x = 0$ lorsque $t = 0$, on obtient, après intégration :

$$\frac{x_L}{x_L - x} = e^{kt}$$

pour t suffisamment petit ($kt < 1$), l'approximation $e^{kt} = 1 + kt$ est valable et l'on peut écrire cette équation sous la forme :

$$\frac{x_L}{1 + kt} = x_L - x$$

ou mieux :

$$x = \frac{x_L t}{\frac{1}{k} + t}$$

c'est l'équation d'une hyperbole équilatère exprimant la variation de x en fonction du temps et dont l'asymptote est x_L la distance de migration limite vers laquelle tend la protéine.

Cette équation analogue à celle de MICHAELIS-MENTEN peut être linéarisée par une transformation similaire à celle de LINEWEAVER - BURK :

$$\frac{1}{x} = \frac{1}{kx_L} \cdot \frac{1}{t} + \frac{1}{x_L}$$

L'ordonnée à l'origine, $\frac{1}{x_L}$, déterminée par extrapolation, peut être reliée à la concentration limite en gel T_L , chaque lot de gels GRADIPORE étant accompagné d'une fiche technique décrivant la variation exponentielle de T en fonction de la distance le long du gel.

$$\log T = ax + b$$

Enfin, MANWELL a montré l'existence d'une relation linéaire analogue à celle de TOMBS (MAURER, 1971, p. 10) entre la taille limite des pores ($1/T_L$) et le rayon moléculaire effectif qui est directement proportionnel à la racine cubique de la masse moléculaire. Il suffit de se reporter à une droite d'étalonnage pour déterminer M connaissant T_L :

$$\frac{1}{T_L} = a M^{1/3} - b$$

La régression linéaire avec $r^2 = 0,986$ indique que 98,6 % des variations de $1/T_L$ sont explicables par les différences de masses moléculaires dans un domaine de 13500 à 900000.

1.3.2. Matériels et réactifs .

On utilise le même type d'appareillage, le même tampon et les mêmes gels GRADIPORE que dans l'électrophorèse selon MARGOLIS & KENRICK.

1.3.3. Conditions opératoires .

Pour déterminer $\frac{1}{x_1}$ à partir des diagrammes de $1/x = f(\frac{1}{t})$, huit points sont nécessaires.

On opère dans les mêmes conditions que précédemment, à la différence que chaque échantillon est déposé dans son alvéole avec un décalage d'une heure sur le précédent. L'électrophorèse est arrêtée une heure après le dépôt du dernier.

Les gels sont alors sortis de leur cassette, les protéines étalons colorées au Noir amido et les formes de BuChE révélées selon la technique de JUUL. Lorsqu'après séjour dans l'acide acétique à 7 %, les gels ont repris leurs dimensions initiales, les distances de migration des protéines sont mesurées.

2. DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE DU MONOMERE .

Si notre hypothèse centrale se révélait exacte, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) et d'un agent réducteur, devrait dissocier et dénaturer tous les membres de notre famille de polymères et les réduire à leur fond commun, la forme monomérique dont il deviendrait possible, par la même occasion, de déterminer la masse moléculaire.

2.1. Principe .

Bien que la technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS soit parfaitement codifiée, son application à notre problème nous a créé des difficultés.

La première difficulté tenait à la nature de notre matériau: le sérum sanguin. Un milieu complexe, contenant une forte concentration et une multitude d'espèces protéiques dont certaines, en interaction

avec d'autres ou avec des composés lipidiques. Une majorité de glycoprotéines, dont notre enzyme, certaines connues pour se lier très mal au SDS. Le milieu devait donc être suffisamment dénaturant pour que toutes les protéines oligomériques ou pluricaténaires soient dissociées en leurs sous-unités.

Le nombre de molécules de SDS liées à une chaîne polypeptidique étant approximativement égal à la moitié du nombre de résidus d'acides aminés que contient la chaîne, REYNOLDS & TANFORD (1970 a et b) estiment que 1,4 g de SDS se fixe par gramme de protéine lorsque la concentration en SDS est supérieure à $8.10^{-4}M$.

Ce très haut niveau de liaison confère à chaque chaîne polypeptidique complexée au SDS une charge négative pratiquement constante par unité de masse et, par suite de la création d'un champ répulsif, donne à ces complexes une structure relativement rigide, en bâtonnet, dont la longueur, dans un domaine bien délimité, est proportionnelle à la masse moléculaire. La charge électrique de chaque complexe étant fonction de sa longueur, il vient que la mobilité relative, dans un système donné, est proportionnelle à la masse moléculaire (WEBER & OSBORN, 1969).

$$R_m = f(\log M)$$

Les complexes polypeptide-SDS ayant tous une mobilité libre voisine, la détermination du R_m n'est pratiquée que dans un seul gel de concentration T (NEVILLE, 1971).

Les auteurs assurent que la masse moléculaire peut ainsi être déterminée avec une précision de $\pm 10\%$.

Donc, avec un échantillon contenant une concentration en protéines de l'ordre de 60 mg/ml, nous devons nous placer dans des conditions telles que la dissociation soit totale et le taux de fixation du SDS maximum, sous peine de dénaturation partielle et de comportements électrophorétiques anormaux.

La technique de STKLOSA & LATZ (1974) qui n'admet le SDS que dans la solution contenant l'échantillon fut mise en échec. Nous

sommes donc restés très près de la technique de WEBER et al. (1972) dans laquelle le SDS est présent à tous les niveaux (échantillon, gel, tampon circulant). Nous y avons cependant apporté quelques modifications, notamment en augmentant la quantité de β -mercapto-éthanol lors de la préparation de l'échantillon.

La deuxième difficulté fut plus complexe à résoudre. La question qui se posait en effet était celle de la détection du monomère.

Etant donné le nombre d'espèces protéiques présentes, seule une méthode spécifique devait être envisagée; une telle méthode ne pouvait que faire appel à l'activité enzymatique de la BuChE sur un substrat chromogène ou à la fixation préalable d'un inhibiteur organophosphoré tel que le DFP tritié ou marqué au ^{32}P . Nous avons dû écarter cette deuxième solution étant donné l'inévitable fixation du DFP sur les arylestérases. Mais comment détecter le monomère par son activité enzymatique alors que l'interaction avec le SDS détruit toute structure tertiaire organisée, a fortiori celle du centre actif?

Le problème qui se posait était donc, après la séparation électrophorétique, de reconstituer la structure fonctionnelle du monomère en éliminant le SDS.

REYNOLDS & TANFORD (1970 b) ont montré que l'interaction entre les chaînes polypeptidiques et le SDS est diminuée lorsque la force ionique augmente. Donc, après électrophorèse, nous avons placé nos gels dans des tampons de molarité croissante, en présence de substrat (méthode de JUUL ou de GUILBAULT), dans l'espoir de voir apparaître une zone d'activité. Aucun résultat ne put être enregistré.

Cependant, ROSENBUSH & WEBER (1971) s'étaient trouvés dans une situation analogue à la notre avec l'aspartate transcarbamylase d'E.coli. Leur problème était le recouvrement de l'activité enzymatique après une électrophorèse en présence de SDS. Ils le résolurent en éliminant le SDS par de l'urée 6 M. L'urée entre probablement en compétition avec le SDS. On sait que les complexes polypeptidiques - SDS ont un très haut niveau de structure secondaire (MATTICE et al. 1976) et l'urée intervient certainement en provoquant principalement la rupture des liaisons hydrogènes intramoléculaires. D'autre part,

les interactions entre le SDS et la chaîne polypeptidique sont de type hydrophobe et l'urée doit aussi agir directement sur ces liaisons en les affaiblissant. Donc, deux mécanismes au moins contribuent à la dissociation des complexes SDS-polypeptides.

Lorsque le SDS est désengagé de ces complexes, on l'élimine en le fixant sur une résine échangeuse d'anions.

Les agents dissociant du type de l'urée dénaturent les protéines en les transformant en pelote statistique; leur départ s'accompagne, en général, du recouvrement de la structure native, et donc de l'activité enzymatique (TANFORD, 1968). Donc, après transformation du bâtonnet en pelote statistique sous l'action de l'urée, il suffisait d'éliminer l'agent dénaturant, par dialyse, pour reconstituer la structure enzymatique native fonctionnelle.

WEBER & KUTER (1971) ont ainsi proposé une méthode générale de renaturation des enzymes après traitement au SDS. Nous avons donc appliqué cette méthode aux circonstances présentes et, bien que le recouvrement de l'activité cholinestérasique soit loin d'être total, nous l'évaluons entre 10 et 20 %; la réaction chromogène est cependant suffisante pour localiser la zone contenant l'enzyme, déterminer sa mobilité relative et, en se rapportant à la droite d'étalonnage, donner une estimation de la masse moléculaire du monomère.

2.2. Réactifs pour l'électrophorèse en présence de S.D.S.

. Solution mère d'acrylamide/méthylène bis acrylamide.

(BIS/A = 1/37 - C = 2,63 %)

- Acrylamide -----	22,2 g
- BIS -----	0,6 g
- Eau distillée q.s.p. -----	100 ml

Cette solution se conserve plusieurs mois à l'obscurité à + 4°C.

. Tampon phosphate du gel : 0,2 M; μ = 0,47; pH 7,2

- NaH_2PO_4 , H_2O -----	7,8 g (0,56 M)
- Na_2HPO_4 , 12 H_2O -----	51 g (0,139 M)
- SDS (SERVA recristallisé et de pureté 99%)	2 g (6,93.10 ⁻³ M)
- Eau distillée q.s.p. -----	1000 ml

. Tampon de circulation : 0,1 M; μ = 0,236; pH 7,2

- Tampon phosphate du gel ----- 1 vol.

- Eau distillée ----- 1 vol.

. Tampon phosphate de dissociation : 0,01 M;

μ = 0,0236; pH 7,2

Solution A :

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ----- 1,38 g (0,02 M)

- Eau distillée q.s.p. ----- 1000 ml

Solution B :

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ----- 3,68 g (0,01 M)

- Eau distillée p.s.p. ----- 1000 ml

Solution tampon :

- Solution A ----- 370 ml

- Solution B ----- 670 ml

- SDS ----- 1 g ($3,46 \cdot 10^{-3}$ M)

- β -mercaptoéthanol (FLUKA) ----- 1 g (1,14 ml)

. TEMED

à conserver à + 4°C, en flacon coloré.

. Persulfate d'ammonium

- 15 mg/ml eau distillée

- Préparation extemporanée

. Solution de Bleu de Bromophénol à 0,05 %

. Solution saturée de saccharose dans l'eau distillée.

2.3. Préparation des gels .

Nous avons utilisé les mêmes tubes (PRECIBORE) que pour l'électrophorèse annulaire.

Les solutions sont préalablement dégazées pendant 15 minutes et amenées à la température du laboratoire. Il est nécessaire d'effectuer toutes les opérations suivantes à 20°C. Le SDS est insoluble

ble au dessous de 15°C.

Solutions (ml)	Concentrations finales [T %]		
	10	7,5	5
Solution A/BIS	13,5	10,1	6,75
Eau distillée	0	3,4	6,75
Tampon du gel	15	15	15
Persulfate d'ammonium	1,5	1,5	1,5
TEMED	0,045	0,045	0,045

Dès que le mélange est réalisé, les tubes sont rapidement remplis sur une hauteur de 60 mm et recouverts d'une couche d'eau de 5 mm .

La polymérisation est terminée en moins de 30 minutes.

Les gels ne présentant aucune discontinuité dans le pH, il est possible de les préparer plusieurs jours à l'avance et de les conserver dans le tampon du gel à la température du laboratoire.

2.4. Préparation des protéines étalons .

2.4.1. Protéines étalons

Protéines	Sources	masses moléculaires
Lactotransferrine	Zymo	89000
S.A.B.	Pentex	68000
Ovalbumine	Sigma	43000
Alcool deshydrogénase de levure	Calbiochem	37000
Cytochrome C de coeur de cheval	Calbiochem	13000
Hémoglobine	Koch.Light.Lab.	4 x 16000
γ-globuline bovine fraction II	Calbiochem	2 x 23000 (L) 2 x 53000 (H)

2.4.2. Préparation des solutions étalons à 0,5 mg/ml

- Protéine ----- 3 mg

- Tampon de dissociation ----- 6 ml

Incubation 2 h au bain-marie à 37°C.

2.4.3. Préparation des échantillons étalons

- Solution étalon à 0,5 mg/ml ----- 100 μ l

- β -mercaptoéthanol ----- 5 μ l

- Solution de BBPh ----- 5 μ l

- Solution saturée de saccharose --- 2 gouttes

2.5. Préparation de l'essai .

2.5.1. Préparation du sérum dénaturé

- Sérum ----- 1 ml

- Tampon de dissociation ----- 9 ml

Incubation 2 h au bain-marie à 37°C.

2.5.2. Préparation de l'échantillon-essai

- Solution de sérum dénaturé ----- 50 μ l ($\sim 325\mu$ g)

- β -mercaptoéthanol ----- 5 μ l

- Solution de BBPh ----- 5 μ l

- Solution saturée de saccharose --- 2 gouttes

2.6. Electrophorèse .

2.6.1. Matériel

L'appareillage est le même que dans l'électrophorèse annulaire .

2.6.2. Purification des gels

Plusieurs auteurs ont remarqué que le persulfate d'ammonium peut donner lieu à des artefacts dans ce type d'électrophorèse. On l'élimine par préélectrophorèse de 30 minutes, sous une intensité de 4 mA/tube avec, dans les deux bacs, le tampon pH 7,2; 0,2 M.

2.6.3. Mode opératoire de l'électrophorèse

Après remplissage des deux compartiments de la cuve avec le tampon de circulation 0,1 M; pH 7,2 et élimination des bul-

les d'air, 30 μ l de chacune des solutions échantillons sont déposés à la surface des gels, sous le tampon, afin d'éviter les turbulences.

Avec une intensité constante de 5 mA/tube, la migration que l'on suit par le déplacement du BBPh s'accomplit en 3 ou 4 heures, à la température du laboratoire, selon la concentration du gel.

Après électrophorèse, on mesure la longueur des gels avant coloration, soit l , et la distance de migration du colorant traceur, soit x_{BBPh} .

2.6.4. Coloration des protéines étalons

Les gels sont colorés au Bleu de Coomassie, selon la procédure décrite au chapitre IV, paragraphe 1.2.5.2. (p.109).

2.6.5. Etalonnage

Après décoloration, on mesure la longueur des gels, soit l' , et la distance de migration des protéines étalons x_p .

On exprime alors la mobilité relative par la relation :

$$R_m = \frac{l}{x_{\text{BBPh}}} - \frac{x_p}{l'}$$

puis on trace la droite d'étalonnage :

$$R_m = f(\log M)$$

2.7. Renaturation de l'enzyme après électrophorèse

2.7.1. Réactifs

. Tampon A pH 7,8

- TRIS ----- 6,05 g (0,05 M)
- Acide acétique ----- 3 g (0,05 M)
- Eau distillée q.s.p. ----- 1000 ml

. Tampon B pH 7,8

- Tampon A ----- 1000 ml

- β -mercaptoéthanol ----- 0,78 g(0,01 M)

. Tampon C

- Tampon B contenant 6 M d'urée (MERCK pour usage biochimique)

- Préparation extemporanée

. Résine échangeuse d'anions

La résine DOWEX 1 X 1 50/100 mesh (FLUKA) sous forme de chlorure est d'abord lavée avec abondance par NaOH 2N, puis avec de l'eau, ensuite avec de l'acide acétique 4 N, puis rincée à l'eau et enfin équilibrée avec le tampon A. Elle peut être stockée à + 4°C plusieurs mois en suspension dans ce tampon.

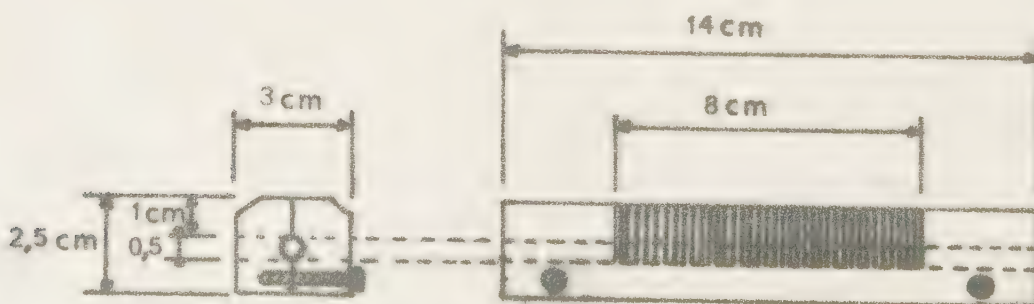
Juste avant utilisation, elle est transférée dans le tampon C .

2.7.2. Matériel

. Sacs à dialyse de diamètre de 1 cm environ.

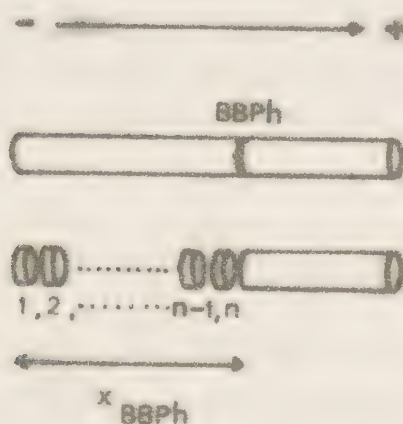
. Appareil à tronçonner les gels.

Cet appareil, réalisé dans un bloc de plexiglass de 2,5 X 3 X 14 cm, a été confectionné par les ateliers de la Pharmacie Centrale des Armées (Orléans). Il est séparable en deux parties égales formant au milieu une gorge de diamètre 5 mm, destinée à recevoir le gel. La partie supérieure a été creusée à la fraise de 1/10 jusqu'à la base de la gorge, afin de permettre de sectionner le gel, à la lame de rasoir, en tranches d'épaisseur moyenne $\bar{e} = 1,5 \text{ mm}$.



2.7.3. Mode opératoire

Les gels contenant l'essai sont sectionnés à l'aide du tronçonneur sur une longueur égale à la distance de migration du BBPh.



Soit n tranches d'épaisseur moyenne $\bar{e} = \frac{x_{BBPh}}{n}$

Chaque tranche de gel est placée dans un tube à hémolyse en incubation dans 1 ml de tampon C pendant 30 minutes, à la température ambiante sous agitation mécanique.

Puis on introduit 0,5 ml de la suspension de résine et l'on soumet les tubes à une nouvelle agitation pendant 15 minutes. Après sédimentation de la résine, on prélève le surnageant pour l'introduire dans les petits sacs à dialyse.

La dialyse s'effectue à + 4°C, pendant 24 heures, contre du tampon A que l'on renouvelle toutes les 6 heures.

Lorsque l'urée est totalement éliminée, on peut procéder à la détection de l'activité enzymatique.

2.8. Détection de l'activité cholinestérasique .

Les sacs à dialyse sont ouverts et leur contenu introduit dans n tubes à hémolyse.

La mise en évidence de l'activité cholinestérasique n'a pu être réalisée que par la méthode de GUILBAULT (chapitre IV , 1.

2.6.2.). La méthode d'ELLMAN, très sensible, a été écartée en raison de la présence encore possible dans le milieu de traces de β -mercaptoéthanol pouvant réduire le DTNB.

Dans chaque tube à hémolyse, on introduit 25 μ l de NMIA en solution dans le méthylcellosolve. Après 5 minutes d'incubation au bain-marie à 37°C, une coloration verte se développe dans les tubes où se manifeste une activité cholinestérasique.

2.9. Détermination de la masse moléculaire du monomère.

Connaissant l'épaisseur moyenne d'une tranche de gel, une coloration prenant naissance au $n^{\text{ième}}$ tube signifie que le monomère avait migré d'une distance $x_m = n \cdot \bar{e}$.

La mobilité relative du monomère est donc :

$$R_m = \frac{1}{x_{\text{BBPh}}} \cdot \frac{n \cdot \bar{e}}{l'}$$

Or, $l = l'$ puisque le gel est sectionné avant coloration.

Donc :

$$R_m = \frac{n \cdot \bar{e}}{x_{\text{BBPh}}}$$

En se rapportant à la droite d'étalonnage, on lit alors le $\log M$ correspondant à R_m .

3. DETERMINATION DES CONSTANTES DE SEDIMENTATION APPARENTES .

3.1. Principe .

En référence aux travaux de LA MOTTA et al. (1970), nous avons adopté la technique de JOLLEY et al. (1967)

Au tampon utilisé pour former le gradient de saccharose

5-20 %, on incorpore de l'acrylamide et du BIS tel que l'on ait T = 7,7 %, ainsi que du TEMED et de la riboflavine. A l'échantillon sont incorporées les protéines étalons en solution dans le tampon-acrylamide. Après la centrifugation, les tubes sont exposés devant une rampe de tubes fluorescents. L'acrylamide se polymérise, le gradient de saccharose étant alors stabilisé de façon définitive, on peut révéler les marqueurs protéiques ainsi que les zones d'activité cholinestérasique de la même manière qu'après électrophorèse sur gel.

Les constantes de sédimentation et les masses moléculaires apparentes sont calculées au moyen de la relation de MARTIN & AMES (1961) par rapport aux deux étalons (sérum albumine humaine : $S_{20,W}^0 = 4,6$ et $M = 69000$ et catalase $S_{20,W}^0 = 11,3$ et $M = 250000$).

$$\frac{\text{Distance de migration de } x}{\text{Distance de migration de ref}} = \frac{S_x}{S_{\text{ref}}} = \left[\frac{M_x}{M_{\text{ref}}} \right]^{2/3}$$

3.2. Matériel .

Toutes les centrifugations ont été réalisées sur une centrifugeuse BECKMAN L2-65 B, équipée d'un rotor à godets oscillants SW 50-1 et dans des tubes en nitrate de cellulose.

3.3. Réactifs pour la centrifugation .

. Solution A : Tampon pH 8,8 - TEMED

- TRIS -----	36,3 g (3 M)
- HCl 1N -----	48 ml
- TEMED -----	0,23 ml
- Eau distillée q.s.p. -----	100 ml

. Solution B : Acrylamide à T = 30,8 %

- Acrylamide -----	30 g
- BIS -----	0,8 g
- Eau distillée q.s.p. -----	100 ml

. Solution C : Riboflavine

- Riboflavine ----- 4 mg
- Eau distillée q.s.p. ----- 100 ml

Conservation plusieurs semaines en flacon noir au réfrigérateur.

. Solution I : Solution gélifiante d'acrylamide (T = 7,7 %, pH = 8,8, ρ = 1,125)

Cette solution qui constitue le solvant de saccharose doit être préparée dans une chambre noire avec, pour seul éclairage, une lumière inactinique afin d'éviter la polymérisation de l'acrylamide .

- Solution A ----- 4 ml (=tampon TRIS à 0,375 M)
- Solution B ----- 8 ml
- Solution E ----- 4 ml
- Eau distillée ----- 16 ml

. Solution II : saccharose à 20 % p/p

- Dissoudre 4,5 g de saccharose dans 16 ml de solution I.

. Solution III : saccharose à 5 % p/p

- Dissoudre 0,95 g de saccharose dans 16 ml de solution I.

Ces deux dernières solutions doivent être préalablement dégazées à l'obscurité et conservées à + 4°C avant l'utilisation.

3.4. Mode opératoire .

. Fabrication du gradient

Les gradients ont été réalisés à l'aide d'un appareil classique en plexiglass fabriqué par les ateliers du C.R.S.S.A. et constitué de deux compartiments de diamètre égal, pouvant recevoir chacun 2,8 ml de solution. Le mélange des deux solutions est assuré par un agitateur entraîné par un petit moteur électrique.

Avec un débit de 1 ml/min, le gradient est réalisé en 5 mi-

nutes environ. On contrôle sa linéarité par incorporation de Bleu de Bromophénol à la solution la plus dense (solution II). Après 2 heures de repos à + 4°C, on procède au fractionnement à l'aide d'un fractionneur de gradient de densité ISCO, modèle 640. Chaque fraction de 0,1 ml est collectée et l'on mesure sa densité optique à $\lambda = 590 \text{ nm}$.

La fabrication des gradients, tout comme celle des trois dernières solutions, doit être menée avec beaucoup de précautions, en travaillant dans une quasi obscurité.

. Pose de l'échantillon

Après 2 heures d'équilibrage à + 4°C, un échantillon de 100 μl constitué d'une dilution au 1/20 de sérum (5 μl) dans de la solution I teintée au BBPh et contenant 1 μl de catalase (SERVA) est déposé au sommet de chaque gradient.

. Centrifugation

Dès que les échantillons sont appliqués, les tubes sont introduits dans leur godet et on lance la centrifugeuse. L'opération se déroule à + 4°C, pendant 18 heures, avec une vitesse de 35000 tours par minute.

. Révélation des zones d'activité BuChE et des marqueurs

A la fin de la centrifugation, les tubes sont placés sur un portoir en plexiglass ne les tenant qu'aux deux extrémités sur 1 mm, on recouvre les gradients d'une couche d'eau de 4 mm, puis on les expose pendant 30 minutes devant deux rampes de tubes fluorescents. Après la polymérisation, les gels sont démoulés et colorés. Les zones d'activité BuChE sont révélées selon la technique de JULI, mais étant donné le volume plus important et le diamètre de 12 mm des gels, on les immerge successivement dans 20 ml de solution de préincubation, puis d'incubation. L'albumine humaine étalon interne ayant fixé le BBPh est déjà colorée et l'on peut immédiatement mesurer sa distance de migration.

La position de la catalase est révélée par une réaction spécifique mettant à profit ses propriétés catalytiques. L'oxygène libéré par l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme, oxyde la benzidine et un composé de coloration bleue, diffusant peu, apparaît au niveau de la zone catalasique.

. Réactif à la benzidine

- Benzidine (PROLABO) ----- 1 g
- Acide acétique ----- 10 ml
- Eau distillée ----- 30 ml

On fait bouillir jusqu'à dissolution, puis on ajoute :

- Eau distillée q.s.p. ----- 50 ml

Cette solution doit être conservée à l'abri de la lumière.

. Eau oxygénée 0,2 M

On introduit chaque gel dans 5 ml de tampon Tris/glycolle pH 8,4 et 1 ml de la solution de benzidine acétique. Après 3 minutes d'incubation, on ajoute 1 ml d'eau oxygénée 0,2 M.

La zone d'activité catalasique se colore rapidement en bleu et l'on mesure sa distance de migration.

4. DETERMINATION DU VOLUME SPECIFIQUE PARTIEL APPARENT .

Nous avons pu estimer le volume spécifique partiel apparent ($\bar{v}$) à partir de la mesure de la variation de la vitesse de sédimentation dans des gradients de saccharose réalisés dans des solvants de densités différentes : l'eau et l'eau lourde, et en appliquant le protocole expérimental de BON et al. (1973), aux conditions de JOLLEY et al. (1967).

A partir des données de MUENSCH et al. (1976) concernant la composition en aminoacides et en glucides de la forme tétramérique de la BuChE du sérum humain, il nous a été possible de déterminer la valeur théorique de $\bar{v}$ en suivant la méthode de calcul de COHN & EDSALL (1943).

4.1. Détermination par ultracentrifugation .

4.1.1. Principe

Selon l'hypothèse de MARTIN & AMES (1961), la vitesse de migration d'une protéine soumise à la force centrifuge dans un gradient de saccharose est constante en tous points. Ainsi, le rapport des distances traversées par deux protéines est constant et égal au rapport de leurs constantes de sédimentation.

$$\sigma = \frac{x_i}{x_{\text{ref}}} = \frac{S_i}{S_{\text{ref}}}$$

On peut écrire une relation de la forme :

$$S = \alpha x$$

dans laquelle x est la distance parcourue, proportionnelle à la vitesse, et où α est un paramètre dépendant de la durée et de la vitesse de centrifugation.

S est donc une constante de sédimentation apparente dépendant des conditions du milieu, température et densité, ainsi que du volume spécifique partiel.

Dans un gradient préparé dans l'eau lourde, la vitesse de sédimentation est plus faible et la distance parcourue x' sera inférieure à x .

Ainsi,

$$S' = \alpha x'$$

et la relation de MARTIN & AMES devient :

$$\sigma' = \frac{x'_i}{x'_{\text{ref}}} = \frac{S'_i}{S'_{\text{ref}}}$$

L'équation de SVEDBERG définit la relation qui existe entre S et les paramètres moléculaires. Dans un solvant aqueux, on peut l'écrire :

$$S = \frac{DM}{RT} \cdot (1 - \bar{v} \rho)$$

ρ représente la densité du milieu en l'absence de saccharose, soit $\rho = 1,0828$, dans nos conditions. On est obligé d'introduire une nouvelle approximation et de supposer ρ constante, alors qu'en réalité, elle croît du ménisque vers le fond du tube. En fait, cette approximation est sans conséquence puisque les termes impliqués se retrouvent à la fois au numérateur et au dénominateur dans les relations suivantes.

Dans l'eau lourde, l'équation de SVEDBERG devient :

$$S' = \frac{DM}{RT} (k - \bar{v} \rho')$$

k représente la variation de masse due à l'échange non spécifique protons-deutérons dans la protéine. EDELSTEIN & SCHACHMAN (1967) ont déterminé la valeur de ce paramètre pour l'albumine du sérum de boeuf et l'on admet, en général, que cette constante égale à 1,0155 est la même pour toutes les protéines. Ainsi, la masse moléculaire d'une protéine deutérée est égale à kM , le volume molaire est également affecté et le volume spécifique partiel devient $\bar{v}/k$.

ρ' la densité du milieu en l'absence de saccharose est égale à 1,1878 dans nos conditions expérimentales.

En comparant les vitesses de migration de nos enzymes et des marqueurs, dans l'eau et dans l'eau lourde, on peut en tirer la valeur du volume spécifique partiel $\bar{v}_i$ des différentes formes de BuChE.

Soit,

$$\Phi = \frac{\sigma}{\sigma'}$$

$$\Phi = \frac{S_i}{S_{ref}} \cdot \frac{S'_{ref}}{S'_i} = \left(\frac{1 - \bar{v}_i \rho}{k - \bar{v}_i \rho'} \right) \cdot \left(\frac{k - \bar{v}_{ref} \rho'}{1 - \bar{v}_{ref} \rho} \right)$$

4.1.2. Matériels et mode opératoire

Les réactifs, le matériel et les conditions expéri-

mentales sont les mêmes que pour la détermination des constantes de sédimentation par la technique de JOLLEY et al. (1967), exceptée la solution A tampon-TEMED, pH = 8,4, constituée de :

- TRIS ----- 0,50 g
- Glycocolle ----- 4 g
- TEMED ----- 0,20 ml
- H₂O ou D₂O q.s.p. ----- 100 ml

L'eau lourde employée pour la préparation des différentes solutions provient du C.E.A. (teneur isotonique en D₂O : 99,83 % et densité $\rho_{D_2O, 4^\circ C} = 1,105$) .

La densité de la solution I préparée dans l'eau est égale à 1,0828; dans l'eau lourde elle est de 1,1878. Compte-tenu des variations de masses, les quantités de saccharose des solutions II et III doivent être corrigée.

4.2. Détermination à partir de la composition en glucides et en aminoacides .

A partir des données bibliographiques concernant la composition en aminoacides et en glucides de la BuChE et connaissant le volume spécifique de chaque résidu d'acide aminé (COHN & EDSALL, 1943), ainsi que de chaque résidu glucidique rencontré dans les glycoprotéines (GOTTSCALK, 1966, p. 61), il nous a été possible de calculer le volume spécifique partiel égal à la somme des contributions des résidus aminoacides et glucidiques, en négligeant toutefois les phénomènes d'électrostriction dus aux groupes chargés. Ils sont d'ailleurs négligeables et semblent compensés par des facteurs stériques (CHARLWOOD, 1957).

Si une protéine contient n_i moles d'un $i^{\text{ème}}$ résidu de masse moléculaire M_i et de volume molaire apparent Φ_i , le volume molaire apparent de la protéine, Φ_p , est :

$$\Phi_p = \sum_i n_i \cdot \Phi_i$$

La masse moléculaire de la protéine, M_p , est égale à :

$$M_p = \sum_i n_i M_i$$

Son volume spécifique apparent est donc :

$$\bar{v}_p = \frac{1}{\rho_p} = \frac{\Phi_p}{M_p} = \frac{\sum_i n_i \Phi_i}{\sum_i n_i M_i}$$

En solution, le volume spécifique apparent est identique au volume spécifique partiel qui représente l'incrément de volume produit dans la solution par unité de masse du soluté (protéine) ajouté.

Le calcul de $\bar{v}_p$ s'effectue à partir des volumes spécifiques des résidus, sachant que :

$$\bar{v}_i = \frac{\Phi_i}{M_i}$$

On tire :

$$\bar{v}_p = \frac{\sum_i n_i \bar{v}_i M_i}{\sum_i n_i M_i}$$

Compte-tenu que chaque aminoacide est engagé dans une liaison peptidique qui consomme une molécule d'eau, il convient d'enlever 18 à la masse moléculaire de chaque aminoacide.

Ainsi :

$$M_i = M_{AA} - 18$$

Le même raisonnement doit être appliqué aux résidus glucidiques liés par liaisons osidiques.

5. DETERMINATION DU POINT ISOELECTRIQUE .

Après plusieurs tentatives infructueuses d'électrofocalisation sur plaques de polyacrylamide et, en particulier, sur sys-

tème PAG-Plate LKB, nous avons été conduit à mettre au point une technique d'électrofocalisation en tubes de gel de polyacrylamide qui, seule, nous a permis de localiser avec une bonne précision, les zones d'activité cholinestérasique. La détection de ces zones fut cependant difficile à résoudre, à cause de la présence des ampholines qui interféraient avec certains composés intervenant dans nos réactions histochimiques.

Nous avons donc pu, de cette manière, déterminer les points isoélectriques (pI) sur le sérum natif ou après traitement par la neuraminidase (NANASE).

Dans le but de chiffrer l'importance de la contribution des résidus d'acide N-acétylneuraminique à la valeur du pI de l'enzyme native, nous avons calculé le pI théorique qu'aurait l'enzyme si elle ne renfermait aucun résidu de NANA et si tous ses groupements ionisables étaient exposés, en résolvant les équations théoriques de HILL (1942) pour 4 types de résidus ionisables (arginine, lysine, acide glutamique et acide aspartique) d'après la composition en aminoacides donnée par MUENSCH et al. (1976).

5.1. Détermination par électrofocalisation en gel de polyacrylamide .

5.1.1. Principe

La technique que nous avons mise au point dérive de celles de WRIGLEY (1968) et de RIGHETTI & DRYSDALE (1971) et ne nécessite que le matériel classique de l'électrophorèse annulaire. Le gradient de pH créé à l'aide du mélange d'ampholines LKB de pH 3 à pH 10, est stabilisé par un gel de polyacrylamide de T = 7 % et par une concentration élevée de saccharose.

La mesure de la variation du pH est effectuée à l'aide d'un mélange de protéines de points isoélectriques connus et couvrant toute l'échelle.

5.1.2. Réactifs pour l'électrofocalisation

- . NaOH ----- 0,02 M; pH = 11,9
- . H₃PO₄ ----- 0,01 M; pH = 2,45
- . Solution d'acrylamide/méthylène bis-acrylamide T = 21 % C = 3,45 %
 - acrylamide ----- 20,275 g
 - BIS ----- 0,725 g
 - Eau distillée q.s.p.- 100 ml
- . Solution de saccharose à 27 %
- . Solution de riboflavine : 4 mg/100 ml d'eau distillée .
- . Ampholines LKB à 40 %

5.1.3. Préparation des gels de T = 7 %

- . Solution d'acrylamide/Bis ----- 10 ml
- . Solution de saccharose ----- 15 ml
- . Ampholines :
 - pH 3,5 - 10 ----- 2,7 ml
 - pH 3 - 6 ----- 0,5 ml
 - pH 4 - 6 ----- 0,2 ml
 - pH 5 - 8 ----- 0,2 ml
 - pH 6 - 8 ----- 0,2 ml

Le mélange de ces solutions est dégazé pendant 10 minutes, puis l'on ajoute :

- . Solution de riboflavine ----- 1,2 ml

Il faut 1,6 ml de solution gélifiante pour remplir complètement un tube de 7,6 cm sur 5 mm de diamètre.

L'échantillon (5 μ l) de sérum natif ou traité à la NANase depuis 24 heures est dispersé dans ce volume de solution.

Dans les mêmes conditions sont préparés les gels contenant les protéines étalons (mélange de protéines de points isoélectriques

connus SERVA) : 5 μ l d'une solution à 10 mg/ml de NaCl 9 ‰ sont répartis dans chaque gel.

PROTEINES ETALONS

Protéines	pI
Ferritine	4,4
Sérum albumine bovine	4,7
β -lactoglobuline	5,34
Ovalbumine	5,90
Myoglobine de cheval	7,3
Myoglobine de cachalot	8,3
Ribonucléase	9,45
Cytochrome C	10,65

Après une photopolymérisation de 30 minutes, devant une rampe de tubes fluorescents de type "lumière du jour", les gels peuvent être soumis à l'électrofocalisation.

5.1.4. Mode opératoire de l'électrofocalisation

Après fixation des tubes, le bac cathodique supérieur est rempli de soude 0,02 M, tandis que le bac anodique reçoit l'acide phosphorique 0,01 M.

L'opération est conduite à puissance constante de 30 W pour 8 tubes, afin que l'effet Joule soit constant. L'intensité initiale de 2,5 mA/gel décroît progressivement tandis que le champ électrique passe de 20 V/cm à 53 V/cm ($U_0 = 120$ V et $U_f = 400$ V).

Au bout de 6 heures, à + 4°C, la focalisation est terminée.

5.1.5. Coloration des protéines

. Solution de fixation

- Méthanol -----	300 ml
- Eau distillée -----	700 ml
- Acide sulfosalicylique -----	34,5 g
- Acide trichloracétique -----	115 g

. Solution de coloration

- Bleu de Coomassie R 250 -----	1,150 g
- Ethanol -----	250 ml
- Acide acétique -----	80 ml
- Eau distillée q.s.p; -----	1000 ml

Cette solution doit être conservée en flacon teinté.

. Solution de décoloration

- Ethanol -----	250 ml
- Acide acétique -----	80 ml
- Eau distillée q.s.p. -----	1000 ml

Chaque gel est placé 30 minutes dans la solution de fixation, on retourne fréquemment pour faciliter la diffusion. La coloration s'effectue avec la seconde solution en 10 minutes, au bain-marie, à 60°C. L'excès de colorant est chassé par lavages successifs avec la solution de décoloration.

5.1.6. Détection des zones d'activité cholinesté- rasique

Trois techniques ont été mises en oeuvre selon deux modalités différentes : sur les gels entiers en utilisant, soit la technique de GUILBAULT avec le NMIA ou celle de JUUL modifiée en fonction des conditions présentes; et sur des sections de gels obtenues avec notre tronçonneur, en révélant l'activité selon la méthode d'ELLMAN.

. Technique de GUILBAULT

Le protocole opératoire ainsi que les réactifs ne diffèrent pas de ce que nous avons énoncé au chapitre IV, paragraphe 1.2.6.2. Cependant, il est nécessaire d'opérer fréquemment un retournement des tubes afin d'équilibrer au même pH le gel dans sa totalité.

. Technique de JUUL modifiée

Les ampholines, acides polyaminés polycarboxyliques donnent, avec les ions cuivriques, des complexes bleus intenses, en les déplaçant des chélates qu'ils forment avec le glycolle, et diffusent assez mal hors du gel.

Le problème qui se pose est donc l'élimination des ampholines dont la présence empêche la formation des complexes blancs de thiocholine-cuivre.

On pratique tout d'abord trois lavages successifs de 10 minutes chacun, avec 5 ml de tampon phosphate 0,067 M, pH 6,2, puis trois lavages avec la solution de préincubation pendant le même temps; enfin, 2 heures d'incubation à la température ambiante, en renouvelant la solution toutes les 15 minutes. On laisse la réaction se poursuivre une nuit au réfrigérateur. Dans ces conditions, les complexes thiocholine-cuivre apparaissent de façon très nette.

. Technique d'ELLMAN

Chaque tronçon est mis en présence de 10^{-3} M de BuSch, selon le protocole défini au chapitre III, paragraphe 2.4. Le temps d'incubation est de 30 minutes, à la température du laboratoire et à l'obscurité.

5.2. Calcul théorique .

Soit une molécule ampholite, une protéine, en solution aqueuse. Celle-ci, aux pH extrêmes, peut prendre un nombre maximum de charges positives m ou un nombre maximum de charges négatives n

La protéine pourra donc exister sous différents états d'

ionisation i , régis chacun par une constante de dissociation K_{m-i+1} .

$$i = -n, -n+1, -n+2 \dots 0, \dots m-2, m-1, m.$$

$$K_{m-i+1} = \frac{x \cdot u_{i-1}}{u_i}$$

x représente la concentration en ions H^+ , u_i la concentration molaire de l'ion de charge i .

La conditions isoélectrique est définie pour :

$$\sum_{k=-n}^m k u_k = 0$$

et le pI représente la concentration H^+ dans les conditions de neutralité électrique.

La solution de cette équation est :

$$\begin{bmatrix} m & m-1 & m-2 & \dots & -n+2 & -n+1 & -n \\ k_1 & -x & 0 & \dots & 0 & 0 & 0 \\ 0 & k_2 & -x & \dots & 0 & 0 & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & -x & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \dots & K_{m+n-1} & -x & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & K_{m+n} & -x \end{bmatrix} = 0$$

On peut l'écrire par la formule de sommation suivante :

$$\sum_{k=0}^{m+n} (m-k)x^{m+n-k} \prod_{i=1}^k K_i = 0$$

Pour résoudre cette équation, on est obligé de faire un certain nombre d'approximations et d'admettre :

- que les seuls groupements ionisables de la protéine sont : le groupement guanidinium de l'arginine, le groupement ϵ - NH_2 de la lysine, le groupement γ -carboxylique de l'acide glutamique et le β -carboxylique de l'acide aspartique.

- Que tous ces groupes sont exposés à la surface de la protéine et qu'ils n'interagissent pas entre eux. C'est-à-dire que la variation d'énergie libre d'interaction électrostatique, $\Delta G^0(\bar{z}) = 2 w \bar{z}$, doit être nulle (cette énergie correspond au travail nécessaire pour qu'un proton se fixe sur la protéine malgré le champ électrique créé par un nombre de charges moyen $\bar{z}$).

Si $\Delta G^0(\bar{z}) = 0$, cela implique que le facteur d'interaction de DEBYE, W , est nul, ce qui n'est pas le cas dans la réalité.

Dans ces conditions, la constante de dissociation intrinsèque de chaque groupe $K_{i, \text{int}}$ est égale à la constante de dissociation K_i :

$$K_i = K_{i, \text{int}} \cdot e^{\Delta G^0(\bar{z}) / RT}$$

$$K_i = K_{i, \text{int}}$$

- Que les interactions avec le milieu extérieur ne modifient pas la valeur du pI. En d'autres termes, que le pI est confondu avec le point isoionique, valeur du pH pour laquelle la charge globale de la protéine en solution aqueuse est nulle $\bar{z} = 0$.

Sur la base des données de MUENSCH et al. (1976) concernant la composition en aminoacides du C_4 , il est donc possible d'estimer le point isoélectrique que cette forme aurait, aux approximations près, si elle était totalement désialylée.

Résidu	Nombre (a)	Groupe ment ionisable	pKa à 25°C	Ka	aKa
Arg.	125	Guanidinium	12,48	$K_2 = 3,31 \cdot 10^{-13}$	$41,38 \cdot 10^{-12}$
Lys.	180	$\epsilon\text{-NH}_2$	10,53	$K_3 = 2,95 \cdot 10^{-11}$	$5,31 \cdot 10^{-9}$
Glu.	223	$\gamma\text{-COOH}$	4,07	$K_4 = 8,51 \cdot 10^{-5}$	$18,98 \cdot 10^{-3}$
Asp.	222	$\beta\text{-COOH}$	3,86	$K_5 = 1,38 \cdot 10^{-4}$	$30,64 \cdot 10^{-3}$

Nous avons donc un système constitué de 4 types d'acides déterminant $m = 2$ (arginine et lysine) et $n = 2$ (acides glutamique et aspartique). Donc, on peut écrire l'équation de HILL comme suit :

$$\sum_{k=0}^4 (2-k) x^{4-k} \prod_{i=1}^k K_i = 0$$

En accord avec les conventions usuelles, le produit de zéro facteurs est égal à l'unité et la somme de zéro termes égale à zéro, donc cette somme de produits s'écrit :

$$2x^4 + K_2x^3 - K_2K_3K_4x - 2K_2K_3K_4K_5 = 0$$

N'ayant pu simplifier cette équation ni lui appliquer le théorème de d'Alembert, pour sa résolution, nous avons dû faire appel à une méthode de calcul par itération et nous aider d'un ordinateur.

Etant donné que $m + n = 4$ est pair, on peut écrire l'équation de HILL sous une forme qui se prête plus facilement aux calculs sur ordinateur :

$$\sum_{k=1}^{m+n+1} (m+1-k) x^{m+n+1-k} \prod_{i=1}^k K_i = 0$$

avec pour conditions $K_1 = 1$ on obtient une équation identique à la précédente :

$$2x^4 + K_2x^3 - K_2K_3K_4x - 2K_2K_3K_4K_5 = 0$$

Le but du programme est de déterminer ce polynôme en x^4 par le calcul de ses coefficients eux-mêmes calculés à partir de la formule :

$$A_k = (m+1-k) \prod_{i=1}^k a_i K_i$$

k variant de 1 à $m+n+1 = 5$,

a représentant le nombre de chaque résidu.

Nous obtenons le polynôme :

$$f(x) = A_1x^4 + A_2x^3 + A_3x^2 + A_4x + A_5$$

Il faut rechercher les zéros et, parmi ceux-ci, celui qui est donné pour une racine positive x_0 , avec enfin :

$$pI = -\log x_0$$

Pour garantir l'unicité de la racine positive, outre $K_1=1$, les quatre constantes d'ionisation des groupements concernés doivent être classées dans l'ordre suivant :

$$K_2 < K_3 < K_4 < K_5$$

et multipliées par a_i avant d'être introduites dans les données.

Le calcul des racines repose alors sur la détermination d'un trinôme $x^2 + p_0x + q_0$ qui divise exactement le polynôme. Il apparaît que la racine positive du trinôme est la racine positive du polynôme en x^4 recherchée.

Ce programme en FORTRAN IV dont nous donnons l'organigramme à la page suivante, nous a été établi par la division de Psychologie Expérimentale du C.R.S.S.A., grâce à l'obligeance du Pharmacien-chimiste en Chef JACQ. Les calculs ont été effectués dans ce même service, sur ordinateur Télémécanique 1600.

PROGRAMME DE CALCUL POUR LE POINT ISOELECTRIQUE THEORIQUE.

```

01      DIMENSION A(5),B(5),C(5),CAM(5)
02      READ(129,100)(CAM(I),I=1,5),M,N
03 100  FORMAT(5E9.2,2I2)
04      READ(129,101)PO,QO
05 101  FORMAT(2E8.1)
06      READ(129,102)EPS
07 102  FORMAT(E8.1)
08      L=0
09      DO1 K=1,5
10      PI=1.
11      DO2 I=1,K
12      2 PI=PI*CAM(I)
13      1 A(K)=(M-K+1)*PI
14      X0=(-PO+SQRT(PO**2-4.*QO))/2.
15      X0=-ALOG(X0)/ALOG(10.)
16 13  L=L+1
17      B(1)=A(1)
18      B(2)=A(2)-PO*B(1)
19      DO3 K=3,5
20      3 B(K)=A(K)-PO*B(K-1)-QO*B(K-2)
21      C(1)=B(1)
22      C(2)=B(2)-PO*C(1)
23      C(3)=B(3)-PO*C(2)-QO*C(1)
24      C(4)=-PO*C(3)-QO*C(2)
25      DELTA=C(3)**2-C(2)*C(4)
26      GRANP=C(3)*B(4)-B(5)*C(2)
27      GRANQ=B(5)*C(3)-B(4)*C(4)
28      DELTP=GRANP/DELTA
29      DELTQ=GRANQ/DELTA
30      P=PO+DELTP
31      Q=QO+DELTQ
32      IF(Q)4,5,6
33      4 X=(-P+SQRT(P**2-4.*Q))/2.
34      X=-ALOG(X)/ALOG(10.)
35      IF(ABS(X-X0)-EPS)9,9,10
36 10 IF(L-5)11,11,15
37 15 IF(TEST-ABS(P*Q-PO*QO))12,11,11
38 11 TEST=ABS(P*Q-PO*QO)
39      X0=X
40      PO=P
41      QO=Q
42      IF(L-99)13,16,16
43      5 WRITE(128,200)P,Q
44 200 FORMAT(1X,'UNE RACINE NULLE',/, ' P = ',E10.3,/, ' Q = ',E10.3)
45      GOTO14
46      6 IF(P)7,7,8
47      7 WRITE(128,201)P,Q
48 201 FORMAT(1X,'DEUX RACINES POSITIVES',/, ' P = ',E10.3,/, ' Q = ',E10.3)
49      S)
50      GOTO14
51      8 WRITE(128,202)P,Q
52 202 FORMAT(1X,'DEUX RACINES NEGATIVES',/, ' P = ',E10.3,/, ' Q = ',E10.3)
53      S)
54      GOTO14

```

```

00053      9 WRITE(128,203)X,P,Q
00054 203 FORMAT(1X,'UNE RACINE POSITIVE :XO = ',E10.3,/,', P = ',E10.3,/,',
00054      5 = ',E10.3)
00055      GOTO14
00056      12 WRITE(128,204)P ,Q
00057 204 FORMAT(1X,'SYSTEME DIVERGENT',/,', P = ',E10.3,/,', Q = ',E10.3)
00058      16 WRITE(128,206)PO,QO ,XO
00059      GOTO14
00060 206 FORMAT(1X,'CONVERGENCE TROP LENTE:NB D ITERATION MAX ATTEINT',/,
00060      S P = ',E10.3,/,', Q = ',E10.3,/,', UNE RACINE POSITIVE:XO = ',E10.
00061      14 WRITE(128,205)L
00062 205 FORMAT(1X,'NB. D ITERATION = ',I2)
00063      STOP
00064      END

```

6 - DETERMINATION DE LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE LIBRE PAR ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE DE DENSITE CROISSANTE.

Si, par extrapolation à $T = 0 \%$, la méthode d'HEDRICK & SMITH permet de déterminer les mobilités libres relatives (R_{m_0}), on peut envisager le calcul des mobilités absolues des quatre formes dans un gel de polyacrylamide présentant un gradient de concentration en partant de la méthode de MANWELL (1977), mise au point pour la détermination des masses moléculaires.

6.1. Principe .

La vitesse de migration d'une protéine dans un gel de polyacrylamide présentant un gradient de concentration est fonction de sa mobilité électrophorétique.

$$v = \frac{dx}{dt} = k (x_L - x)$$

Sous l'action du champ électrique $\vec{E}$, une particule de charge $q = Ze$ et de coefficient de friction f , va se mouvoir. En régime stationnaire, la force $\vec{F}$ qui l'entraîne est égale à :

$$F = qE = fv$$

$$v = \frac{dx}{dt} = \frac{q}{f} \cdot E$$

Ainsi :

$$m = \frac{k}{E} (x_L - x)$$

Ecrivons l'équation de MANWELL

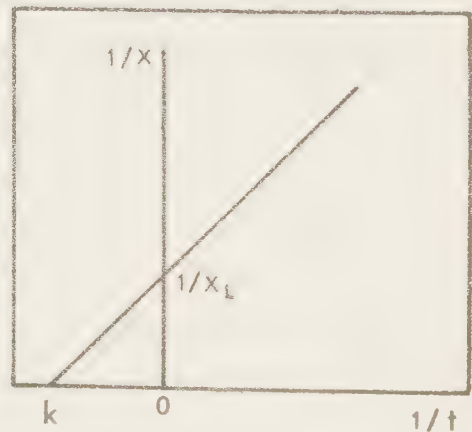
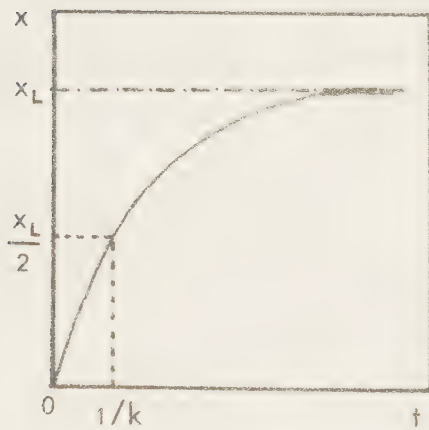
$$x = \frac{x_L t}{\frac{1}{k} + t}$$

Sous forme inverse :

$$\frac{1}{x} = \frac{1}{k} \cdot \frac{1}{x_L t} + \frac{1}{x_L}$$

k , l'abscisse à l'origine a les dimensions de l'inverse d'un temps et $1/k$ représente en fait le temps nécessaire à une protéine donnée pour parcourir la distance $x = x_L/2$. C'est une grandeur caractéristique d'une protéine migrant dans des conditions définies.

$$t_{0,5} = \frac{1}{k}$$



Sachant que :

$$t_{0,5} = \frac{1}{k} = \frac{1}{mE} \left(x_L - \frac{x_L}{2} \right)$$

La mobilité moyenne entre $x = 0$ et $x = \frac{x_L}{2}$ peut donc s'écrire :

$$\bar{m} = \frac{x_L}{2.E.t_{0,5}}$$

En réalité, cette mobilité moyenne n'a aucune signification moléculaire puisqu'elle dépend à la fois de la mobilité libre de la protéine, de son coefficient de retardement et de la forme du gradient de concentration d'acrylamide; elle ne présente donc aucun intérêt pratique.

Cependant, la connaissance de K_R , de $T = f(x)$ et de $t_{0,5}$ peut nous permettre d'accéder directement à la valeur de la mobilité libre.

En effet, la mobilité électrophorétique, fonction de la concentration d'acrylamide T , nous est donnée par la relation de FERGUSON :

$$\text{Log } m = \text{log } m_0 - K_R T$$

soit :

$$m = m_0 e^{-2,3 K_R T}$$

Pour la commodité de l'exposé, nous fixons arbitrairement à 1 Volt/cm le champ électrique.

$$\text{Or, } T = f(x)$$

Ainsi :

$$m = \frac{dx}{dt} = m_0 e^{-2,3 K_R f(x)}$$

$$dt = \frac{1}{m_0} e^{2,3 K_R f(x)} dx$$

L'intégration de $y = \int (dt)$ entre $t = 0$ et $t = 1/k$ nous donne :

$$t_{0,5} = \frac{1}{m_0} \int_0^{L/2} e^{2,3 K_R f(x)} dx$$

La détermination de m_0 est donc possible si l'on connaît

$$T = f(x)$$

$$m_0 = \frac{1}{t_{0,5}} \int_0^{L/2} e^{2,3 K_R f(x)} dx$$

6.2. Mode opératoire .

Nous avons travaillé sur plaque de gel GRADIPORE dans les conditions opératoires décrites au § 1.3.3 (mode opératoire pour la détermination des masses moléculaires par la méthode MANWELL (1977) et pu, ainsi, déterminer simultanément la masse moléculaire et la mobilité électrophorétique libre à pH 8,4 de chaque forme de la BuChE par la construction des diagrammes $1/x = f(1/t)$. La prolongation des droites jusqu'à leur intersection avec l'axe des abscisses permet de déterminer k (h^{-1}).

Les valeurs des K_R des quatre formes nous ont été apportées par la mesure des pentes des droites, $\log 100 R_m = \log 100 R_{m_0} - K_R \cdot T$, tracées initialement pour la détermination de la masse moléculaire par la méthode d'EDRICK & SMITH. (Les plaques de gel GRADIPORE ont le même C % que les gels utilisés dans ces manipulations; donc, K_R , qui dépend de C %, est équivalent dans les deux systèmes).

La concentration d'acrylamide $T = f(x)$ nous a été donnée par les fiches de contrôle qui accompagnent chaque lot de gels. Ainsi, à partir des indications graphiques fournies par le fabricant, nous avons pu déterminer que la concentration d'acrylamide est une fonction parabolique de x , de la forme :

$$T = ax^2 + bx + c$$

avec, $c = T$ au sommet de la plaque ($x = 0$) (les valeurs de a , b et c varient légèrement d'un lot à l'autre).

Ainsi :

$$m_0 = \frac{1}{E \cdot t_{0,5}} \int_0^{L/2} e^{2,3 K_R (ax^2 + bx + c)} \cdot dx$$

$$m_0 = \frac{1}{E \cdot t_{0,5}} \int_0^{L/2} e^{(a'x^2 + b'x + c')} \cdot dx$$

L'intégration de l'exponentielle donnant une expression complexe, il nous a paru plus simple de construire le graphe de la fonction $y = e^{f(x)}$ et de déterminer, par la méthode des trapèzes, l'aire comprise au-dessous, entre les bornes $x = 0$ et $x = x_L/2$.

Enfin, le champ électrique a été mesuré aux bornes de chaque plaque de gel, à l'aide d'un voltmètre digital de précision Advance Instruments, modèle Alpha II .

CHAPITRE VI

DETERMINATION DES PARAMETRES FONCTIONNELS APPARENTS

1. PRINCIPE

Afin de déterminer les paramètres catalytiques des différentes formes de notre enzyme, il nous a paru intéressant d'adapter, pour ce travail, la technique que CHIU et al. ont proposé en 1972 (a) pour l'étude cinétique directe d'une forme d'acétylcholinestérase d'érythrocyte de boeuf après électrophorèse sur un gel de polyacrylamide. Dès que l'électrophorèse est terminée, les auteurs transfèrent les gels dans un tampon pH 7, pendant 10 minutes, afin qu'ils s'équilibrent à ce pH, puis les placent dans des solutions de ce même tampon contenant le substrat (α -naphtyl acétate ou esters de la thiocholine) à des concentrations croissantes. Après 15 minutes d'incubation la réaction enzymatique est stoppée, et l'on révèle les zones d'activité par une réaction chromogène. L'intensité de la coloration proportionnelle à la vitesse d'hydrolyse est mesurée par photodensitométrie des gels.

$$\text{Absorbance} = k.v$$

Bien que les courbes d'hydrolyse $v = f(t)$ soient, selon les auteurs, rigoureusement linéaires, la mesure de la vitesse à $t = 15$ minutes pour construire les courbes $v = f(S)$ ne nous a pas semblé satisfaisante. En effet, seule la mesure de la vitesse initiale v_i ,

c'est-à-dire la vitesse d'hydrolyse en phase stationnaire, permet de tracer les courbes $v = f(S)$ de façon rigoureuse. Donc, contrairement à CHIU et al qui mesurent la densité optique après un temps d'incubation constant, il nous a paru préférable, pour chaque concentration de substrat, de déterminer la vitesse initiale en prenant la tangente à l'origine des courbes d'hydrolyse en fonction du temps : $v_i = \text{tg}\alpha$.

2. MODE OPERATOIRE .

La technique histochimique que nous avons utilisée pour mesurer l'activité est celle de JUUL. Nous avons toujours opéré à $25^\circ \pm 0,1^\circ\text{C}$. Cinq concentrations de butyrylthiocholine : (S) : $4 \cdot 10^{-3}$; $3 \cdot 10^{-3}$; $2 \cdot 10^{-3}$; $1,25 \cdot 10^{-3}$; $1 \cdot 10^{-3}$ M, nous ont permis de tracer les courbes $v_i = f(S)$ et les diagrammes de LINEWEAVER-BURK pour la détermination de $K'm$ et de $V'max$ apparents. Pour chaque concentration de substrat, les courbes $v = f(t)$ ont été tracées point par point, en mesurant la densité optique des zones de complexes acide rubéanique - Cu^{++} à l'aide d'un photodensitomètre APELAB D.I.4, positionné sur filtre rouge. Huit séries de mesures ont été pratiquées à chaque concentration. Pour les plus faibles, nous avons dû augmenter les temps d'incubation afin de pouvoir mesurer l'activité des formes les moins importantes.

Concentrations (S). 10^3	temps d'incubation (min)							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
4	5	10	15	20	30	50	70	90
3	5	10	15	20	30	50	70	90
2	10	20	30	50	70	90	110	130
1,25	20	30	50	70	90	110	130	150
1	20	30	50	70	90	110	130	150

Les pourcentages d'activité des 4 formes ont été déterminés par mesure de la densité optique, après 90 minutes d'incubation,

pour une concentration de 4.10^{-3} M, c'est-à-dire une concentration telle que la vitesse soit la plus voisine possible de $V'_{\max}$ et ne dépende, théoriquement, que de la concentration en enzyme.

$$V'_{\max} = k'_c E_m \quad \text{Moles.litre}^{-1}.\text{sec.}^{-1} .$$

k'_c : constante catalytique vraie.

E_m : concentration molaire d'enzyme
(mole d'enzyme par litre de gel) .

L'appareil APELAB conçu pour la mesure densitométrique des électrophorèses sur acétate de cellulose ne permettant pas la lecture directe des boudins de polyacrylamide, nous avons dû confectionner un réceptacle pour palier ce handicap.

Cette cuve de mesure est composée d'un cadre de plexiglass dont les dimensions internes sont de 70 mm X 8 mm et 8 mm d'épaisseur. Le fond est constitué d'une lame de microscope. Cet ensemble détermine une logette dans laquelle on introduit le gel. Afin que nulle réflexion ou diffusion latérale ne vienne perturber la lecture, on remplit l'espace libre d'acide acétique à 7 % et l'on recouvre complètement le gel de façon que la surface liquidienne soit parfaitement plane.

3. PROBLEMES POSES PAR L'IMMOBILISATION DE L'ENZYME DANS LE GEL DE POLYACRYLAMIDE .

Au plan théorique, la détermination de paramètres cinétiques dans de telles conditions expérimentales, ne va pas sans poser de problèmes.

En effet, il ne s'agit plus d'étudier le comportement catalytique d'une enzyme libre, en solution, mais d'une enzyme immobilisée dans la trame du gel de polyacrylamide. A priori, on peut penser que ses propriétés risquent de s'en trouver altérées.

3.1. Modification des propriétés de l'enzyme .

Quatre raisons principales font que les propriétés de l'enzyme seront effectivement modifiées (LAIDLER & BUNTING, 1973) :

- La migration de l'enzyme dans le gel et les contraintes stériques qui lui sont imposées peuvent induire des variations de conformation, en particulier au niveau du centre actif.

- L'inclusion modifie l'interaction entre le centre actif et le substrat, soit par effets stériques, soit par la nature de l'environnement qui diffère de la solution (en particulier, des produits de la réaction, les complexes thiocholine-cuivre, s'accumulent au voisinage de l'enzyme)

- Il y a partage du substrat entre le gel et la solution. Par conséquent, la concentration en substrat dans l'environnement de l'enzyme est différente du reste de la solution.

- La réticulation du gel est telle que l'enzyme ne peut diffuser à l'extérieur. Par contre, la réaction enzymatique dans le support solide va être contrôlée par les lois de la diffusion. La porosité du gel en fonction de T % affecte, en particulier, le passage du substrat. CHIU & al. (1972 a, 1972 b) ont observé une légère augmentation du K_m et une plus importante augmentation de V_{max} lorsque T % s'élève.

3.2. Effet du partage et de la diffusion du substrat.

Il est difficile de prévoir la nature et l'étendue des effets des contraintes stériques que le gel impose à l'enzyme, mais on peut examiner les conséquences sur la cinétique du partage et de la diffusion du substrat entre la solution et le gel.

Soit, (S) la concentration de la BuSCh dans la solution d'incubation, (S') la concentration à l'interface, on définit P, le coefficient de partition du substrat entre les deux phases.

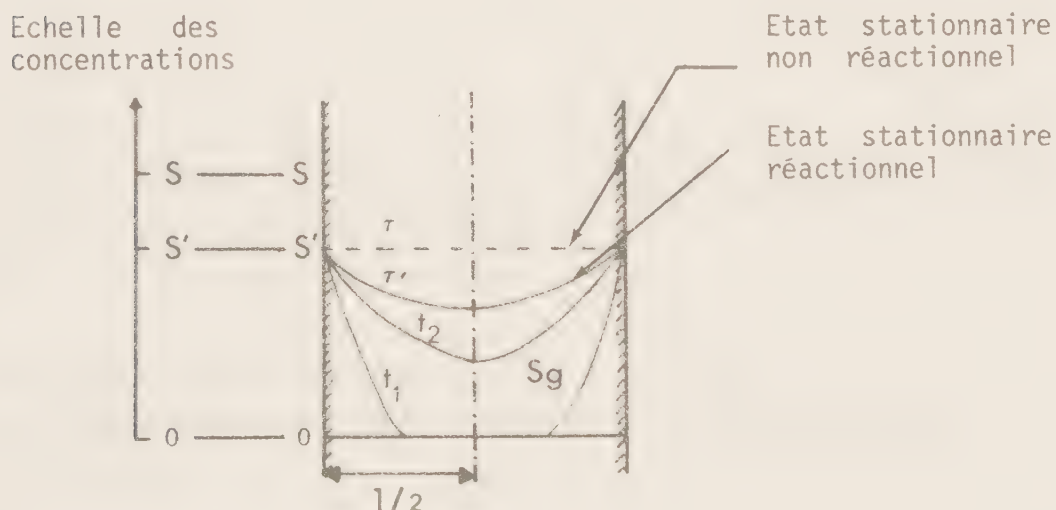
$$P = \frac{(S')}{(S)}$$

Ce coefficient dépend de la structure et de la nature du support. L'existence d'interactions électrostatiques peut considéra-

blement modifier sa valeur. Dans le cas du gel de polyacrylamide, on est assuré d'une neutralité électrique; néanmoins, des interactions de type dipôle-charge, ou dipôle-dipôle peuvent se manifester.

Lorsque le gel est plongé dans la solution contenant le substrat (S), après une courte période de latence t_1 , la concentration initialement nulle dans le gel va progressivement augmenter. S'il ne se produit pas de réaction, on atteindra, au bout d'un temps τ , un état stationnaire non réactionnel de concentration (S') uniforme dans tout le gel.

Par contre, lorsque l'enzyme fonctionne (au niveau de chaque zone, elle est régulièrement distribuée sous forme de disque avec, peut-être, une tendance à être plus concentrée à la périphérie), l'état stationnaire réactionnel n'est pas uniforme et la concentration du substrat passe par un minimum au centre du gel.



La concentration à l'intérieur du gel (S_g) est donc fonction de deux variables x (la distance à la surface) et t (le temps).

$$(S_g) = f(x, t)$$

$$\begin{aligned} t &\in [0, +\infty[\\ x &\in \pm \frac{l}{2} \end{aligned}$$

l représente le diamètre du gel, soit 0,5 cm; (S_g) dépend également de (S') et du coefficient de diffusion D ($\text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$) du substrat.

$$(S_g) = (S') \left[1 - \frac{4}{\pi} \sin \frac{\pi x}{l/2} \exp \left(- \frac{D\pi^2 t}{l^2/4} \right) \right]$$

Cette équation permet donc de calculer le temps τ au bout duquel, à une distance $x = l/2$ (le centre du gel), l'état stationnaire non réactionnel est atteint, c'est-à-dire lorsque (S_g) diffère de $\pm 10 \%$ de (S') .

$$\frac{(S_g)}{(S')} = 1 - \frac{4}{\pi} \sin \frac{\pi}{2} \exp \left(- \frac{D\pi^2 \tau}{l^2/4} \right)$$

$$\frac{9}{10} = \frac{4}{\pi} \exp \left(- \frac{D\pi^2 \tau}{l^2/4} \right)$$

soit :

$$\tau = 0,257 \cdot \frac{l^2}{4D}$$

On ne connaît pas la valeur du coefficient de diffusion de la butyrylthiocholine, cependant NGO & LAIDLER (1975b), estimant à $4 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ celui de l'acétylcholine, on peut admettre que celui de la BuSch est du même ordre de grandeur.

Dans nos conditions expérimentales, l'état stationnaire non réactionnel serait atteint au bout d'un temps de :

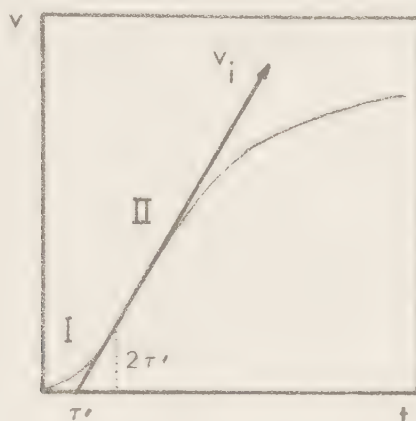
$$\tau = 0,257 \cdot \frac{0,0625}{4 \cdot 10^{-6}} = 4015 \text{ sec}$$

$$\tau = 67 \text{ minutes}$$

L'équilibre est donc très lent à s'établir. Or, pendant ce temps, la réaction enzymatique se poursuit. Il en résulte que cet état stationnaire ne sera jamais atteint et que les molécules d'enzymes situées au centre du gel ne fonctionneront jamais en régime stationnaire.

L'étude des courbes $v = f(t)$, qui ne sont pas rigoureusement hyperboliques, nous permettra de définir un temps τ' , au bout

duquel l'état réactionnel pseudo-stationnaire moyen est atteint.



Dans la zone I, la cinétique est préstationnaire, la concentration en substrat passant de zéro à (S_g) , la concentration des complexes enzyme-substrat va évoluer dans le même sens. A partir de τ' , on entre dans une phase stationnaire. A la périphérie du gel, la concentration $[ES]$ est constante et la cinétique d'ordre zéro mais lorsqu'on se rapproche du centre du gel où l'on est pas encore à saturation, l'ordre réactionnel conserve une valeur intermédiaire entre zéro et un.

La cinétique enzymatique globale que l'on suit par l'apparition des produits, complexes thiocholine-cuivre, qui précipitent in situ, n'est donc pas d'ordre zéro.

Dans ces conditions, il est difficile d'attribuer une signification moléculaire aux paramètres catalytiques que l'on mesure. Simples paramètres phénoménologiques, ils nous permettront toutefois de comparer les différentes formes entre elles.

Dans nos expériences, pour les concentrations élevées, τ' est de l'ordre de 5 minutes mais, aux concentrations les plus faibles, $1,25 \cdot 10^{-3}$ et $1 \cdot 10^{-3}$ M, nous avons observé des temps plus longs et de l'ordre de 12 minutes.

La détermination des vitesses initiales apparentes doit s'effectuer en traçant les tangentes des courbes $v = f(t)$ en prenant le temps τ' comme origine.

Le gradient de concentration qui se forme à l'intérieur du

gel est soumis aux lois de la diffusion.

La vitesse d'accumulation du substrat par cm^2 , sous l'effet de la diffusion, obéit à la 2ème loi de FICK.

$$\frac{\partial S_g}{\partial t} = D \frac{\partial^2 S_g}{\partial x^2} \quad \text{M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}.$$

Lorsque l'état stationnaire est atteint, l'apport de substrat est égal à la quantité qui est consommée par hydrolyse. Diffusion et réaction deviennent interdépendantes. Cette dépendance réciproque entraîne une divergence entre la cinétique en solution et en structure solide.

Si, par hypothèse, on admet que la cinétique de chaque enzyme est michaelienne, la vitesse de la réaction par unité de volume de gel s'exprime par la relation :

$$v = \frac{k'_c [E]_m (S_g)}{K'_m + (S_g)} \quad \text{M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}.$$

k'_c et K'_m peuvent différer des constantes k_c et K_m mesurées en solution pour les raisons que nous avons évoquées. A l'état stationnaire, on a :

$$D \frac{\partial^2 S_g}{\partial x^2} = \frac{k'_c [E]_m (S_g)}{K'_m + (S_g)}$$

La vitesse de passage du substrat au travers de la section du gel ($A = 0,196 \text{ cm}^2$) est proportionnelle au gradient de concentration dS_g/dx et égale à la vitesse de disparition par hydrolyse.

La solution de cette équation est complexe et fait intervenir une fonction hyperbolique F qui varie de 0 à 1.

$$F = \frac{\tanh \gamma x}{\gamma x} \quad \text{avec} \quad \left\{ \begin{array}{l} x = \frac{1}{2} \\ \gamma = \frac{1}{2} \left(\frac{k'_c [E]_m}{D \cdot K'_m} \right)^{1/2} \end{array} \right.$$

Dans notre cas où la vitesse est contrôlée par la diffusion: $F \ll 1$. Lorsque $[E]$ moles d'enzyme sont présentes par unité de volume de gel, la vitesse d'apparition des produits de la réaction v' , dans la

portion de gel de volume A.e (e = épaisseur du disque contenant l'enzyme) est :

$$v' = \frac{k'c. [E]_m. A.e/10^3}{K'_m + (Sg)} = \frac{k'c. [E].(Sg)}{K'_m + (Sg)}$$

or, $P = \frac{(Sg)}{(S)}, (Sg) = P (S)$

Donc,

$$v' = \frac{k'c. [E].(S)}{\frac{K'_m}{PF} + (S)}$$

$$k'c = k'c \text{ app.}$$

$$\frac{K'_m}{PF} = K'_m \text{ app.}$$

Or, $P < 1$ et $F < 1$ donc $K'_m \text{ app} > K_m$

Donc, le coefficient de partition, l'effet de l'environnement et la diffusion contribueront à augmenter la constante de Michaelis.

Il faut s'attendre aussi à ce que l'effet inhibiteur de l'acrylamide monomère non polymérisé contribue aussi à augmenter le K_m et à diminuer la $V_{\max}$, ainsi que l'ont montré NGO & LAIDLER (1975a). Notons que DEGANI & MIRON (1970) avaient déjà observé cet effet sur la BuChE du sérum de cheval, mais l'avaient assimilé à un processus de dénaturation par déplacement des liaisons hydrogène, analogue à l'action de l'urée .

CHAPITRE VII

CONCENTRATION ET SITES ACTIFS

La détermination du nombre de sites présents a pu être effectuée par scintillation liquide après électrophorèse sur gel de polyacrylamide et marquage des sites au $[1,3-^3\text{H}]$ diisopropylphosphofluoridate (^3H -DFP).

Nous avons dû lever un certain nombre de difficultés techniques liées à la nature de l'échantillon et du gel de polyacrylamide.

1. PRINCIPE .

Le titrage des sites actifs, après électrophorèse annulaire en gel de polyacrylamide d'un échantillon préalablement marqué, est couramment pratiqué. Cependant, il est nécessaire de travailler sur un gel de polyacrylamide modifié solubilisable pour le comptage. Plusieurs modifications ont été proposées pour obtenir de tels gels. Nous avons adopté le système d'ANKER (1970) basé sur le remplacement du méthylène-bis-acrylamide par la N,N'diallyl diamide de l'acide tartrique (DATD). Les chaînes d'acrylamide pontées avec ce comonomère peuvent être facilement solubilisées par oxydation des fonctions alcools de l'acide tartrique, au moyen d'acide périodique dilué.

Le sérum contenant un grand nombre de protéines pouvant fixer

le DFP, en particulier les estérases qui migrent au niveau de l'albumine, il n'était pas possible de faire agir le DFP directement sur le sérum puis de mesurer la radioactivité après séparation électrophorétique, tronçonnage et solubilisation des tranches de gel. Non seulement une majorité du DFP se serait fixée dans la zone de l'albumine, mais le bruit de fond aurait été tel que toute mesure se serait avérée vaine.

Nous avons donc pratiqué sur le sérum des électrophorèses en gel de polyacrylamide modifié au DATD afin de séparer nos quatre formes des autres protéines, puis tronçonné exactement les zones correspondant à C_1 , C_2 , C_3 et C_4 et traité séparément chaque forme par le DFP tritié.

2. REACTIFS .

2.1. Solution d'acrylamide-DATD pour gel de séparation
modifié de T = 8,95 % et C = 13,68 %.

Dans ce gel, 1 mole de BIS est remplacée par 3 moles de DATD .

- Acrylamide (Fluka) -----	23,172 g
- N,N'-diallyltartardiamide (Serva) ---	3,675 g (0,0161 M)
- Eau distillée q.s.p. -----	100 ml

2.2. Acide périodique (Merck) à 2 %

2.3. [^3H] DFP (Amersham)

- En solution dans le propylène glycol à la concentration de 5 mCi/ml .
- Titre de pureté 95 % et activité spécifique de 3,4 Ci/mMole.
- 200 μl de la solution de [^3H] DFP sont dilués au 1/5 dans 1 ml de tampon phosphate 0,067 M pH 6,2 puis répartis dans 5 flacons en polypropylène, soit 0,2 mCi/200 μl , et conservés dans l'azote liquide pour éviter les échanges isotopiques.

- 2.4. Tampon phosphate 0,067 M pH 6,2
- 2.5. Mélange scintillant : Insta-gel (Packard)

3. MODE OPERATOIRE .

Les gels de séparation acrylamide-DATD sont préparés de la même façon que les gels classiques et l'électrophorèse de 5 μ l de sérum par gel pratiquée dans les conditions habituelles.

A l'issue de la migration, 2 gels sont traités en vue de détecter les zones d'activité cholinestérasique, tandis que les 6 autres sont simplement placés dans du tampon 0,067 M pH 6,2 .

Dès que les zones blanches apparaissent dans les deux gels témoins, les 6 autres sont alignés côte-à-côte et l'on place aux extrémités les deux gels révélés . On tronçonne alors les sections de gel correspondant aux formes C_1 , C_2 , C_3 et C_4 .

Les 6 tronçons de gel correspondant à chacune des formes sont réunis et introduits dans un tube en polypropylène en présence de 1 ml de tampon phosphate 0,067 M pH 6,2 et de 50 μ l de [^{3} H]DFP dilué, soit 0,05 mCi (0,0147 μ M de DFP) .

On laisse incuber 24 heures au réfrigérateur.

Lorsque le marquage est terminé, on introduit dans chaque tube 2 ml d'acide périodique à 2 % et on laisse la dépolymérisation du gel se poursuivre 4 heures au bain-marie, à 37°C, en retournant fréquemment les tubes.

Les liquides obtenus sont ensuite transférés dans des sacs à dialyse et l'on élimine les excès de [^{3} H] DFP et de persulfate en dialysant 24 heures à + 4°C, contre du tampon phosphate 0,067 M pH 6,2 que l'on renouvelle 4 fois .

A l'issue de cette opération, le contenu de chaque sac à dialyse est vidé dans un pot pour compteur à scintillation, auquel on ajoute 10 ml d'Insta-gel. Après 4 heures de séjour en chambre froide,

l'émission β du tritium est mesurée dans un compteur à scintillation PACKARD TRI-CARB.

4. EXPRESSION DES RESULTATS .

Le nombre de coups par minute que l'on mesure pour chaque forme est proportionnel au nombre de sites actifs contenus dans les 6 tronçons de gels initiaux. Il dépend à la fois de la concentration $[E]$ de chaque espèce enzymatique et du nombre de sites (n) par molécule.

$$\text{cpm}_i = k.n_i [E]_i$$

CHAPITRE VIII

APPROCHE DE LA GEOMETRIE MOLECULAIRE

Les techniques auxquelles nous nous sommes adressé pour la détermination des masses moléculaires et des constantes de sédimentation mettent à profit les propriétés hydrodynamiques des protéines se mouvant dans un tamis moléculaire, sous l'effet d'un champ électrique ou dans un gradient de densité, sous l'effet d'un champ de gravitation.

Or, les propriétés hydrodynamiques, si elles sont liées à la masse, dépendent, en fait, principalement de la taille et de la forme de la molécule.

L'étude théorique de ces propriétés, alliée à l'exploitation des résultats expérimentaux obtenus avec les techniques précédentes, doit donc permettre d'accéder aux paramètres moléculaires de taille et de forme que sont le rayon de STOKES (R_S), le rayon équivalent ($\bar{R}$) et le rapport de friction (f/f_0) et, par ce chemin, à partir d'hypothèses simples, aboutir à la formulation d'un modèle moléculaire.

1. RAYONS MOLECULAIRES .

1.1. Rayon de la sphère équivalente anhydre .

RODBARD & CHRAMBACH (1970) ont développé une théorie unifiée de la filtration sur gel et de l'électrophorèse, complétée en 1976 par COX & TEVEN, expliquant le comportement des macromolécules dans un gel, d'après le modèle qu'OGSTON (1958) avait élaboré pour les milieux constitués d'un réseau de fibres organisées de façon aléatoire.

Ces auteurs ont établi des équations exprimant les interrelations qui existent entre la mobilité électrophorétique, le coefficient de partition, la concentration du gel et le rayon moléculaire.

En électrophorèse sur gel de polyacrylamide, le volume fractionnel f disponible à une molécule sphérique située dans une suspension de fibres linéaires enchevêtrées est égal à :

$$f = \frac{m}{m_0} ; \quad m = m_0 f$$

Dans un gel unidimensionnel ("1-D gel"), dans lequel les fibres sont plus longues que les molécules, le nombre de contacts entre ces molécules et les fibres du gel suit une distribution de POISSON. Le volume fractionnel f correspond à la probabilité de zéro contact, c'est-à-dire le premier terme de la distribution POISSON.

$$f = e^{-lS/4}$$

l représente la concentration totale des fibres exprimée en cm de fibre par cm^3 de gel.

S est la surface externe de la molécule.

f représente donc aussi la surface qui est disponible à la molécule.

On pourra écrire, pour une sphère de surface S , l'expression :

$$S = 4\pi(\bar{R} + r)^2$$

dans laquelle :

$\bar{R}$ est le rayon de la sphère,

r_i le rayon d'une fibre de gel,

donc,

$$f = e^{-\pi l(\bar{R} + r)^2}$$

Pour les molécules non sphériques, on calcule f d'après le rayon d'une sphère équivalente donnant la même probabilité, c'est-à-dire la même surface.

En électrophorèse sur gel, si la mobilité est proportionnelle à T %, donc à la section des pores du gel,

$$p \propto 1/\sqrt{T}$$

(p : rayon moyen d'un pore)

la mobilité m doit être proportionnelle à f .

Ecrivons l'équation de FERGUSON

$$\log_{10} m = \log_{10} m_0 - K_R T$$

Il vient :

$$m = m_0 \cdot e^{-\pi l(\bar{R} + r)^2 T \cdot 2,302}$$

et

$$K_R = \pi l'(\bar{R} + r)^2$$

avec

$$l' = \frac{dl}{dT} = \frac{l}{T}$$

Donc, la pente K_R à partir de laquelle nous avons déterminé M par la méthode d'HEDRICK & SMITH est, en réalité, proportionnelle au rayon de la sphère équivalente anhydre dont le volume V est égal à :

$$V = \frac{4}{3} \pi \bar{R}^3 = \frac{M\bar{v}}{\rho}$$

donc :

$$\bar{R} = \left[\frac{3 M \bar{v}}{4 \pi \rho} \right]^{1/3}$$

K_R est donc constante pour une espèce protéique et pour un taux de réticulation de gel C % donné, mais varie avec la force ionique et le pH.

A l'aide d'une gamme de protéines étalons, de masses moléculaires et de volumes spécifiques partiels connus, on calcule leur $\bar{R}$ puis, après migration électrophorétique dans les mêmes conditions que pour déterminer la masse moléculaire par la méthode d'HEDRICK & SMITH, on trace la droite de régression de $K_R^{1/2}$ en fonction de $\bar{R}$ (équation de RODBARD & CHRAMBACH, 1970).

$$K_R^{1/2} = C_1 (\bar{R} + r)$$

avec :

$$C_1 = \sqrt{\pi} l'$$

et : $\bar{R} = -r$ lorsque $K_R = 0$.

On peut également calculer $\bar{R}$ à partir de la relation

$$\bar{R} = \left[\frac{3MV}{4\pi\bar{v}} \right]^{1/3}$$

connaissant M, déterminée par les différentes techniques électrophorétiques et $\bar{v}$ obtenu par centrifugation.

1.2. Rayon de STOKES

Le rayon de STOKES représente le rayon moyen de la protéine, compte tenu de son asymétrie et de son hydratation.

$$R_s = \left[\frac{3MV}{4\pi\bar{v}} \right]^{1/3} \cdot f/f_0$$

Donc, le rapport du rayon de STOKES sur le rayon de la sphère équivalente anhydre est égal au rapport de friction.

$$\frac{R_s}{R_0} = f/f_0$$

La détermination de R_s ne pose aucun problème et peut être effectuée à l'aide de droites de régression de $K_R^{1/2}$ sur R_s (MILLER

et al., 1975) ou de $\log M$ sur $\log R_S$ des protéines étalons (ANDREWS, 1970).

2. RAPPORT DE FRICTION .

Le coefficient de friction f ne dépend pas seulement de la forme des particules mais aussi de leur volume. Or, les protéines sont plus ou moins hydratées et, de ce fait, leur volume augmente. Le volume de la protéine hydratée V_h est donc la résultante du volume de la protéine anhydre et de l'eau d'hydratation :

$$V_h = \frac{M\bar{v}}{\rho_0} \left[1 + \frac{\omega}{\bar{v}\rho_0} \right]$$

ω : taux d'hydratation (grammes d'eau/gramme de protéine)

ρ_0 : densité du solvant $\simeq 1$.

Le coefficient de friction s'écrit :

$$f = (f/f_0) \cdot f_0$$

f_0 représentant le coefficient de friction de la sphère équivalente,

$$f_0 = 6\pi\eta R$$

Donc, le rapport de friction f/f_0 , le coefficient de friction par rapport à la sphère équivalente, apparaît comme le produit de l'asymétrie (s = shape) et de l'hydratation (h) (ONCLEY, 1941) .

$$f/f_0 = (f/f_0)_s \cdot (f/f_0)_h$$

Ainsi :

$$f = (f/f_0)_s \cdot \left[1 + \frac{\omega}{\bar{v}\rho_0} \right]^{1/3} \cdot 6\pi\eta \left[\frac{3M\bar{v}}{4\pi\rho_0} \right]^{1/3}$$

L'étude de la géométrie de nos formes à partir des rapports de friction a donc nécessité, au préalable, la connaissance de leur masse moléculaire, de leur volume spécifique partiel et du taux d'hydratation.

Dans notre cas particulier, la détermination du taux d'hydratation n'étant pas possible, nous avons été conduit, pour estimer la contribution de la forme de la molécule au rapport de friction, à tester différentes hypothèses et à vérifier leur absurdité ou leur vraisemblance, en envisageant les cas extrêmes de solvation maximale avec asymétrie minimale (sphère de rayon R_S), de solvation minimale avec asymétrie maximale, et un cas intermédiaire avec $\omega = 0,2$ g, considéré comme valeur moyenne pour les protéines globulaires (TANFORD, 1961, pp. 356-361) .

On est donc amené à calculer les rapports théoriques $f/f_{\min}$. Le coefficient de friction minimum ($f_{\min} = f_0$) étant celui de la sphère de rayon $\bar{R}$ et dont $\omega = 0$.

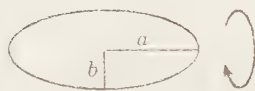
$$f/f_{\min} = (f/f_0)_S \cdot \left[1 + \frac{\omega}{\bar{V} \rho_0} \right]^{1/3}$$

La magnitude de l'asymétrie est alors exprimée par le rapport axial a/b de l'ellipsoïde de révolution qui donne une valeur observée $(f/f_0)_S$. On calcule ce rapport à l'aide de l'équation de PERRIN (TANFORD, 1961, pp. 324-328) qui est une extension de l'équation de STOKES aux ellipsoïdes .

Pour un ellipsoïde de révolution allongé et de volume :

$$v = \frac{4}{3} \pi a b^2$$

avec : $f_0 = 6 \pi \eta \bar{R}$

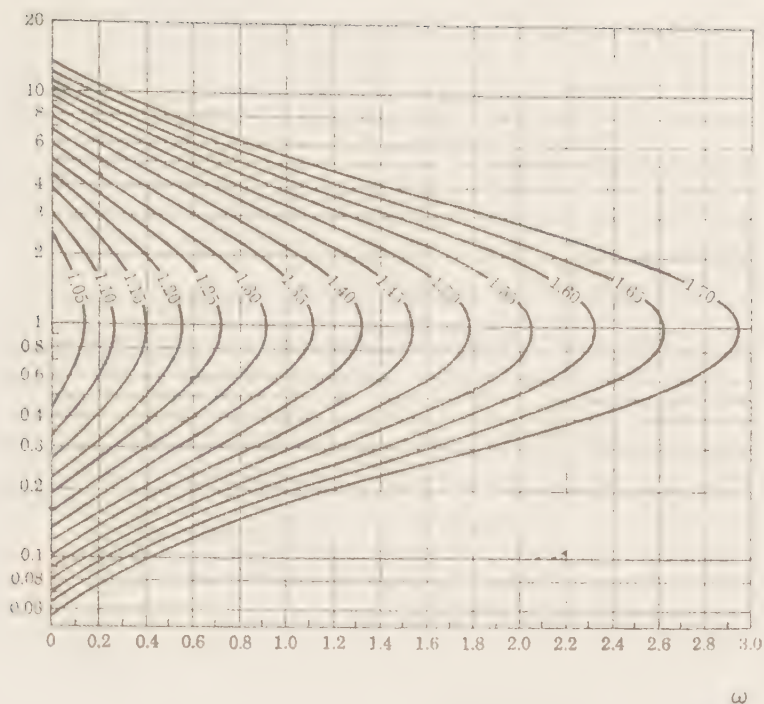


on obtient :

$$f/f_0 = f/6\pi\eta\bar{R} = \frac{(1 - b^2/a^2)^{1/2}}{(b/a)^{2/3} \operatorname{Ln} \frac{1 + (1 - b^2/a^2)^{1/2}}{b/a}}$$

On peut également obtenir la valeur maximum possible de l'asymétrie d'un tel ellipsoïde à l'aide des diagrammes d'ONCLEY (1941).

a/b



Si les données de l'électrophorèse nous offrent la possibilité d'examiner le problème de la géométrie moléculaire par le biais du calcul des rayons, la centrifugation permet l'abord du problème par une autre voie.

On peut évaluer la résistance frictionnelle d'une particule se déplaçant dans le champ de gravitation, par la formule :

$$f = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{S}$$

Ainsi, on obtient une nouvelle expression de la constante de sédimentation S,

$$S = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{(f/f_0) \cdot f_0} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{(f/f_0) 6\pi\eta \chi \left[\frac{3M\bar{v}}{4\pi\chi} \right]^{1/3}}$$

et une expression du rapport de friction en fonction de S :

$$f/f_0 = \frac{1 - \bar{v}\rho}{6\pi\eta S} \cdot \left[\frac{4\pi M^2}{3\bar{v}\chi^2} \right]^{1/3}$$

On peut suivre l'évolution (ou les variations) du rapport de friction lors du passage d'une forme moléculaire (i) à une autre

(i + 1) en formant le rapport de leurs constantes de sédimentation et de leurs masses moléculaires:

$$\frac{(f/f_0)_i}{(f/f_0)_{i+1}} = \frac{S_{i+1}}{S_i} \cdot \left[\frac{M_i}{M_{i+1}} \right]^{2/3}$$

donc, avoir une idée globale des changements qui affectent la géométrie et/ou l'hydratation lors de ces transitions.

Cette dernière équation nous permet de préciser davantage l'évolution de la géométrie d'une séquence de protéines polymériques et d'aborder le problème de la modélisation.

3. MODELES MOLECULAIRES .

Dans le chapitre sur les bases moléculaires des formes multiples, nous avons vu qu'une condition nécessaire pour qu'un oligomère se forme est que chacun de ses monomères possède un environnement équivalent ou pseudoéquivalent (CORNISH-BOWDEN & KOSHLAND , 1971) .

Le nombre de zones de contact sur un monomère doit, nécessairement, être limité, sinon on obtiendrait des polymères ou, plus exactement, des agrégats, composés d'un nombre N très grand de monomères s'associant de façon non spécifique.

Ces zones de contact qui assurent la liaison des monomères doivent également être de conformation très précise.

La formation des différents oligomères s'accompagne donc de la création d'une symétrie moléculaire et de l'apparition de nouvelles propriétés rendant compte d'un arrangement particulier des sous-unités entre elles.

L'étude comparative des propriétés moléculaires, hydrodynamiques notamment, permet de formuler de façon plus précise la géo-

métrie des protéines en faisant appel à des modèles théoriques que l'on peut imaginer par le traitement de l'équation de PERRIN (TANFORD, 1961, pp. 324-328, op. cit.) ou, de façon plus élaborée, à partir des théories de KIRKWOOD (1954) ou de BLOOMFIELD et al. (1967).

3.1. Modèle de PERRIN .

Le rapport des constantes de sédimentation de deux polymères qui sédimentent ensemble,

$$\frac{s_i}{s_{i+1}} = \frac{(f/f_0)_{i+1}}{(f/f_0)_i} \cdot \left[\frac{M_i}{M_{i+1}} \right]^{2/3}$$

permet d'étudier la géométrie de l'un par rapport à l'autre si le rapport de leur masse moléculaire est connu ou admis.

Si le rapport de friction, et donc, le rapport axial des membres de la famille de polymères est constant (en admettant que le taux d'hydratation ne varie pas non plus), l'équation prend une forme plus simple et familière,

$$\frac{s_i}{s_{i+1}} = \left[\frac{M_i}{M_{i+1}} \right]^{2/3}$$

dont MARTIN & AMES (1961) ont su tirer profit.

Une famille de polymères chez laquelle le rapport axial reste constant quel que soit le stade de l'agrégation, obéit à un processus de polymérisation de type expansé : l'ellipsoïde se dilate uniformément dans toutes les directions et conserve sa symétrie.



A l'opposé, on peut imaginer un modèle linéaire, en gousse de pois, également très rigide, dans lequel les sous-unités sont ar-

rangées en ligne et dont le rapport axial relatif est égal au nombre de sous-unités qui constituent l'assemblage.



A partir de l'équation de PERRIN, ou à l'aide de tables (SCHACHMAN, 1959, p.239), on pourra calculer le rapport de friction $(f/f_0)_s$ correspondant au rapport axial et déterminer la valeur théorique du rapport des constantes de sédimentation lorsqu'on passe d'une forme à l'autre.

Les résultats expérimentaux des rapports des constantes de sédimentation sont comparés aux rapports calculés pour les séries de polymères expansés ou linéaires (FISHBEIN et al., 1970 & 1973).

3.2. Modèle de KIRKWOOD .

Un modèle plus souple, dans lequel toutes les déformations sont possibles, peut être traité par la théorie de KIRKWOOD (1954) sur les processus irréversibles, en particulier de l'écoulement hydrodynamique causé par les forces de friction, étendue en 1967, par BLOOMFIELD et al., aux systèmes constitués de sous-unités non identiques.

Selon ce modèle, chaque oligomère est constitué d'un enchaînement de sous-unités monomériques, pouvant occuper toutes les positions spatiales possibles. Pour un nombre N fini de monomères, on obtient donc un polymère ayant l'aspect d'un collier de perles.



La constante de sédimentation d'un tel oligomère est donnée par l'équation

$$S = \frac{M}{n\mathcal{V}} \left[\frac{1}{\zeta} + \frac{1}{6\pi\eta n} \sum_{l=1}^n \sum_{s=1}^n \frac{1}{\langle R_{ls} \rangle} \right]$$

dans laquelle :

n représente le nombre de sous-unités,

ζ le coefficient de friction moléculaire du n-mère,

$$\zeta = f / \omega$$

R_{1s} la distance moyenne entre les centres de deux sous-unités. Pour un dimère, cette distance est égale au diamètre de STOKES : $d_s = 2 R_s = 2$.

On peut donc écrire le rapport théorique des constantes de sédimentation entre le monomère et le n-mère par :

$$\frac{s_1}{s_n} = \frac{n}{n + \sum_{l=1}^n \sum_{s=1}^n \frac{r}{\langle R_{1s} \rangle}}$$

(FISHBEIN et al., 1973 et 1976)

Le rayon de STOKES (ici écrit r plutôt que R_s pour éviter toute confusion) est pris égal à l'unité. Le calcul est simplifié et seules les valeurs de R_{1s} doivent être déterminées. Pour les modèles dont les sous-unités sont assemblées linéairement ou forment entre elles des angles θ de 90° , le calcul est aisé; lorsque l'angle est différent, les distances R_{1s} sont calculées par la règle du cosinus.

Comme pour les modèles précédents, la comparaison des rapports théoriques avec les rapports des données expérimentales définit des invariants qui permettent d'établir un certain nombre d'analogies géométriques entre le modèle et l'enzyme. Bien que de conception relativement simple et grossière, la portée épistémologique d'un tel modèle est grande. Par la figuration de l'enzyme qu'il évoque, il a stimulé notre imagination et, de ce fait, favorisé la conception de nouvelles expérimentations.

CHAPITRE IX

DETERMINATION DE LA NATURE DES INTERACTIONS ENTRE LES SOUS-UNITES

Après avoir déterminé la nature de la multiplicité du système enzymatique plusieurs questions se posaient à nous.

La première concernait la stabilité du système. Les quatre formes existaient-elles dans un rapport constant, quelles que soient les conditions physicochimiques du milieu, ou étaient-elles sensibles à la nature de leur environnement ? Il fallait donc évaluer les possibilités d'interconvertibilité et l'existence d'un équilibre dynamique.

La deuxième interrogation se rapportait à la nature des liaisons qui assurent la cohésion des sous-unités entre elles et par conséquent du système, ces liaisons pouvant être covalentes, électrostatiques, hydrogènes ou hydrophobes, ou correspondre à un pontage par des molécules étrangères.

1. PREPARATION DE FORMES ISOLEES .

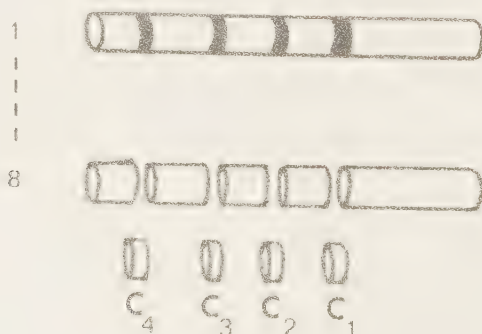
1.1. Principe .

Nous nous sommes inspiré pour ce travail de la méthodologie de RESSLER (1973). Une première électrophorèse sur gel de polyacrylamide a pour but de séparer les différentes formes et de les localiser ; on tronçonne ensuite les sections de gel correspondantes et l'on soumet les tronçons contenant ces formes à une deuxième électrophorèse dans des conditions identiques ou différentes.

L'intérêt de ces opérations est, avant tout, analytique; elles permettent d'examiner le comportement d'une forme enzymatique bien individualisée et, en particulier, d'étudier les facteurs susceptibles de modifier son état d'agrégation. Le second avantage de cette technique est de permettre la préparation, en grande quantité, des formes isolées certes prisonnières dans un tronçon de gel, mais de stockage et conservation faciles.

1.2. Mode opératoire .

Une série d'électrophorèses du sérum est réalisée dans les conditions habituelles à $T = 8 \%$. Les gels sont ensuite traités pour la révélation de l'activité de l'enzyme selon la technique de JUUL. Dès que les zones blanches correspondant aux complexes thiocholine-cuivre commencent à apparaître, on tronçonne les sections de gel correspondantes, on les congèle, puis on les stocke à -18°C , dans des tubes en polypropylène.



La phase suivante peut être pratiquée selon deux modalités :

- traitement particulier suivi d'une électrophorèse simple;
- ou électrophorèse directe en milieu perturbateur.

Chaque rondelle est considérée comme un échantillon et déposée au sommet du gel de concentration "noyée" dans 50 μ l de solution gélifiante de concentration.

2. RECHERCHE DE L'INTERCONVERTIBILITE .

Sur les quatre formes, on pratique des électrophorèses dans des conditions identiques aux précédentes. Après révélation, on note la mobilité de la (ou des) forme (s) observée (s) et l'on mesure son (ou leurs) intensité (s) relative(s).

3. ACTION DU β -MERCAPTOETHANOL (β -MCE)

Notre recherche de ponts disulfures localisés au niveau des jonctions intermonomériques a été guidée par les travaux de ROSENBERRY et al. (1974) et de DUDAI & SILMAN (1974) qui ont mis en évidence ce type de liaison entre les sous-unités de l'acétylcholinestérase d'Electrophorus electricus.

3.1. Principe .

Mise en présence du sérum ou de chaque forme isolée, avec l'agent réducteur, puis électrophorèse classique avec ou sans β -MCE dans le tampon circulant et révélation de l'activité sur les gels.

3.2. Mode opératoire .

0,5 ml de sérum ou chaque rondelle de gel contenant une des formes sont traités par 20 μ l de β -mercaptoéthanol (Fluka), pendant 1 heure, à 22°C.

L'électrophorèse est ensuite pratiquée selon la technique habituelle, en incorporant au tampon circulant 1 mM de β -MCE (89 μ l/l) ou après blocage des groupements thiols par la N-éthylmaléimide (SERVA).

Dans cette seconde voie, on ajoute à l'échantillon traité, 5 μ l d'une solution à 4,8 mM de N-EM, une heure après le β -MCE. Les groupements thiols bloqués, on peut opérer en tampon TRIS/Glycocolle normal.

4. VARIATION DE LA FORCE IONIQUE DU TAMPON CIRCULANT .

4.1. Principe .

Les variations de la force ionique du milieu en agissant sur l'épaisseur de la couche de STERN, modifient les distances de répulsion des sous-unités et induisent leur agrégation ou leur dissociation.

4.2. Mode opératoire .

Nous avons testé l'influence de la force ionique sur l'état oligomérique de la BuChE en pratiquant l'électrophorèse de chacune des quatre formes dans des tampons circulants de forces ioniques comprises entre $1,125 \cdot 10^{-3}$ et 1,0225. Ces tampons ont été préparés à partir du tampon TRIS/glycocolle, pH 8,4, $\mu = 0,0225$, par dilution ou par adjonction de NaCl. Il ne nous a pas été possible de travailler à des forces ioniques très élevées, le NaCl entraînant des perturbations de migration et subissant une électrolyse.

Force ionique	0,001125	0,00225	0,0045	0,01125	0,0225	0,05	0,1225	0,3225	1,0225
Dilution	1/20	1/10	1/5	1/2	1	1	1	1	1
Cl (M)	0	0	0	0	0	0,0275	0,1	0,3	1

Après électrophorèse, on révèle l'activité et l'on mesure l'intensité relative de chaque forme.

5. VARIATION DU pH ET DE LA FORCE IONIQUE .

5.1. Principe .

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en systèmes de tampons multiphasés n'autorise pas des variations importantes du pH

et de la force ionique du tampon circulant, aussi l'étude du comportement des formes multiples de la BuChE à force ionique élevée et à différents pH a été faite sur le sérum par ultracentrifugation en gradient de saccharose 5-20 %. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide n'a pu être pratiquée que pour des pH > 8,4 et en l'absence de NaCl.

5.2. Mode opératoire .

Les gradients de saccharose ont été préparés dans six tampons TRIS/glycocolle de pH différents (pH 5,4 - 7,4 - 8,4 - 9,4 - 10,4 - 11,4). Ces tampons ont été utilisés purs ou additionnés de chlorure de sodium 1 M, 2 M ou 3 M. Nous avons donc joué simultanément sur la variation de pH et de force ionique.

Force ionique des tampons

pH		5,4	7,4	8,4	9,4	10,4	11,4
NaCl (M)	0	0,0560	0,0490	0,0225	0,277	0,658	0,755
	1	1,0560	1,0490	1,0225	1,277	1,658	1,755
	2	2,0560	2,0490	2,0225	2,277	2,658	2,755
	3	3,0560	3,0490	3,0225	3,277	3,658	3,765

Pour ce qui concerne la centrifugation proprement dite, nous avons opéré dans les mêmes conditions que pour la détermination des constantes de sédimentation apparentes, excepté que nous n'avons pas incorporé d'acrylamide aux gradients et qu'à l'issue de la centrifugation, nous avons percé les tubes et récupéré les fractions au moyen d'un collecteur ISCO (modèle 640). Avec un débit de fluide pousseur (saccharose à 40 % teinté au BBPh) de 1ml/min, nous avons collecté une cinquantaine de fractions de 0,1 ml chacune. Leur activité cholinestérasique a été mesurée par la méthode d'ELLMAN (Cf. matériel et méthodes - § III et IV) .

6. ACTION DES SOLVANTS ORGANIQUES .

6.1. Principe .

En établissant des liaisons hydrogène avec certains groupes de la chaîne polypeptidique, les solvants organiques peuvent induire des variations de conformation allant de la modification du taux d'hélicité à des désorganisations de la structure aboutissant à l'agrégation ou à la dissociation. L'abaissement de la constante diélectrique du milieu peut également être à l'origine de phénomènes d'agrégation.

Ce sont ces phénomènes que nous avons cherché à mettre en évidence par électrophorèses pratiquées dans des tampons circulants contenant un solvant organique (SINGER, 1962, p.24).

6.2. Mode opératoire .

L'Ethanol (Merck), le Propylène glycol (Merck) et le Dioxane (Merck) ont été ajoutés en proportions croissantes de 100 à 500 ml par litre, à l'eau servant à préparer le tampon TRIS/glycolle, pH 8,4.

Les électrophorèses ont été pratiquées dans les conditions habituelles en utilisant ces différents tampons. Pour les tampons contenant des pourcentages élevés de solvant organique, nous avons observé des reculs d'ionisation pouvant abaisser le pH jusqu'à 8,15, ainsi que des modifications du voltage et de la vitesse de migration consécutives aux variations de la résistance et à la faible conductance du milieu.

Constantes diélectriques

	eau	propylène glycol	éthanol	dioxane
ε 25°C	78,54	32	24,55	2,21

7. ACTION DES ULTRASONS .

7.1. Principe .

Le mécanisme d'action des ultrasons sur les macromolécules et principalement sur les protéines est encore mal connu; néanmoins, les effets des ondes ultrasonores sont mis à profit pour dissocier les structures cellulaires, subcellulaires, ainsi que les édifices macromoléculaires.

Le passage des ondes ultrasonores dans un milieu liquide provoque, au rythme de la fréquence d'émission, d'importantes variations de pression autour d'une valeur moyenne égale à la pression atmosphérique. Lorsque la pression s'annule, il y a vaporisation instantanée de l'eau et des gaz dissous. C'est le phénomène de cavitation. L'implosion des bulles gazeuses crée des effets mécaniques et thermiques locaux considérables. D'autre part, les vibrations, en augmentant l'agitation moléculaire, accélèrent les collisions. Le résultat global de cet ensemble de phénomènes est variable et peut se traduire par des modifications physicochimiques, des ruptures de liaisons entraînant la dissociation des oligomères, mais également par des phénomènes d'agré-gation (HESS et al. 1964)

7.2. Mode opératoire .

Nous avons effectué le traitement du sérum par les ultrasons, à l'aide d'un appareil piézo-électrique SONIMASSE, modèle 75 TS, émettant une fréquence de 20 KHz avec une amplitude de 6 à 8 μ et développant une puissance maximum de 80 Watts.

En nous reportant aux travaux de DUBBS (1966), la sonotrode introduite verticalement sur une hauteur de 5 cm, dans un tube en nitrate de cellulose contenant 15 ml de sérum immergé dans un bain de glace, nous avons toujours opéré à la puissance maximum, par émissions successives de 30 secondes suivies de temps de repos de 30 secondes, pour éviter la dénaturation thermique de l'enzyme. La durée totale des émissions a été de 150 minutes. A intervalles réguliers, 100 μ l de sérum étaient prélevés pour être soumis à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide à T=8%, afin de suivre la cinétique de l'action des ultrasons sur les formes de la BuChE.

Connaissant la fréquence (ν) et l'amplitude (s_m) d'émission

et en admettant que la vitesse de propagation du son dans le sérum est la même que dans l'eau ($v = 1480$ m/sec), on peut calculer l'amplitude de pression (DION, 1974, pp. 129-133) produite, soit :

$$P_m = \frac{2 \pi \rho v^2 S_m}{\lambda} = 2 \pi \rho v S_m$$

$$\rho (\text{densité du sérum}) = 1,027$$

Ainsi, la pression atteinte dans le sérum au passage de l'onde sera de l'ordre de 1300000 N/m^2 , soit 13 Bars .

C H A P I T R E X

MODIFICATIONS ENZYMATIQUES

Par l'action d'hydrolases sur le sérum ou les formes isolées, nous avons cherché à démontrer le rôle de certaines zones de l'enzyme ou de certains composés dans le processus d'association des sous-unités et dans la genèse de ses formes multiples.

1. ACTION DE LA TRYPSINE .

SAED et al. (1971) ont montré que l'on peut obtenir toutes les formes moléculaires par action des enzymes protéolytiques sur le composant majeur de la BuChE du sérum humain. Cependant, les travaux de CHIU et al. (1972b) sont en contradiction avec ceux-ci : l'action de la trypsine sur la BuChE du sérum de cheval entraîne une perte d'activité de 20 % de la forme majoritaire (I) en 2 heures, alors que la forme II disparaît complètement et que les formes III et IV perdent 80 % de leur activité.

Les études faites sur l'acétylcholinestérase sont beaucoup plus précises et les résultats sont homogènes dans

leur ensemble. Il ressort de ces travaux que certaines espèces d'AChE d'Electrophorus electricus proviennent du clivage protéolytique de la forme 18 S et que le monomère, en particulier, peut engendrer de la même façon plusieurs chaînes polypeptidiques (DUDAI & SILMAN, 1974; ROSENBERRY et al., 1974; CHEN et al., 1974; MORROD et al., 1975) .

1.1. Principe

Nous avons pensé que l'action de la trypsine pouvait, par un traitement individuel, nous apporter des précisions sur la structure sous-unitaire de chaque forme, ainsi que sur l'origine des espèces moléculaires rencontrées occasionnellement ou présentes dans les sérums anciens par comparaison avec celles que le clivage tryptique engendre.

Pour le traitement du sérum total, nous nous sommes, en partie, référé à la technique de SAED et al. (1971). Les sérums anciens sont dilués dans des tampons contenant différentes concentrations de trypsine pancréatique et mis à incuber à 37°C, pendant des temps différents. A l'issue de chacun d'eux, l'action protéolytique de l'enzyme est stoppée par adjonction au milieu de l'inhibiteur de la trypsine.

1.2. Réactifs .

. Tampon de dilution

- Tris -----	0,1815 g (0,15 M)
- NaCl -----	0,8775 g (0,15 M)
- HCl 0,1 N q.s.p. -----	pH 7,4
- Eau distillée q.s.p. -----	100 ml

. Solution de trypsine

Une solution mère de trypsine (Sigma, type III) à 300 µg/ml est préparée par dissolution de l'enzyme dans le tampon précédent. On fabrique à partir de cette solution plusieurs solutions de travail à 200, 150, 100, 75 et 50 µg/ml.

. Inhibiteur de la trypsine

Nous avons utilisé l'Ovomucoïde (Sigma, type II-0), en solution dans NaCl 9 ‰, à la concentration de 15 mg/ml. Un milligramme de cette protéine inhibe 1 mg de trypsine.

1.3. Mode opératoire .

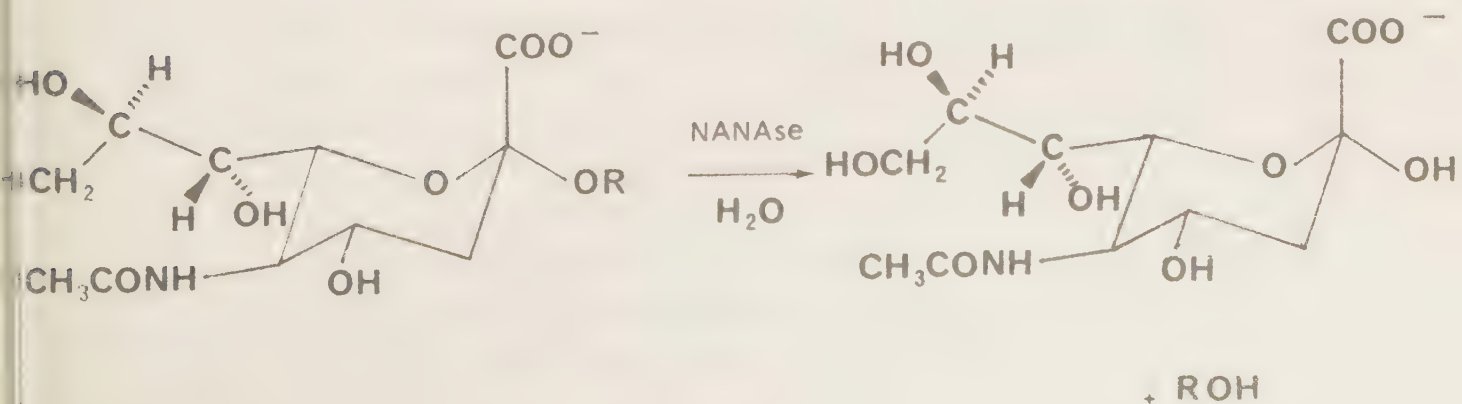
Chaque échantillon de sérum est dilué au 1/6 dans une des solutions de trypsine et placé au bain-marie à 37°C, pendant 15, 30, 45 ou 60 minutes. L'inhibiteur de la trypsine est ajouté à la fin du traitement.

Pour le traitement des formes individuelles, nous avons procédé différemment. Chaque rondelle est dilacérée dans 100 μ l d'une solution de gel de concentration contenant la trypsine à la concentration de 100 ou 300 μ g/ml; on laisse incuber à la température ambiante et à la lumière pendant 15 minutes; on pratique ensuite l'électrophorèse.

2. ACTION DE LA NEURAMINIDASE .

2.1. Principe .

La neuraminidase (NANase) clive spécifiquement les liaisons α -cétosides des résidus d'acide sialique situés aux extrémités des chaînes saccharidiques des glycoprotéines. Cette action a de profondes conséquences sur la structure et la charge nette de ces molécules (BOTTEX & FONTANGES, 1976; HUTCHINSON & KABAYO, 1977).



Son action sur l'activité de la BuChE du sérum humain a été étudiée dès 1962 (b) par AUGUSTINSSON & EKEDAHN, et les résultats de GAFFNEY (1970), de LA MOTTA & WORONICK (1971) suggèrent que l'acide N-acétyl neuraminique (NANA) joue un rôle important dans le maintien de la stabilité des formes de l'enzyme.

Nous avons donc fait agir la neuraminidase de Clostridium perfringens (Sigma, type V) sur le sérum ou les formes isolées, contrôlé l'activité et pratiqué des électrophorèses après ce traitement.

2.2. Mode opératoire .

Le sérum est mis à incuber à 20°C, en présence de l'enzyme, à raison de 0,4 U/ml. On suit, en fonction du temps, l'élimination des résidus NANA et les conséquences qu'elle entraîne sur l'activité totale et la répartition des formes moléculaires de l'enzyme.

Pour l'étude des formes individuelles, chaque rondelle de gel est dilacérée dans 50 μ l de gel de concentration contenant 0,022 U de NANase et mise à incuber 3 heures, à l'obscurité, à 20°C.

3. ACTION DES PHOSPHOLIPASES .

Le traitement du sérum par les phospholipases A, C et D a eu pour but de mettre en évidence l'interaction de phospholipides avec les formes multiples de la BuChE. Cette recherche a été motivée par la valeur élevée du volume spécifique partiel (0,78 ml/g) de la BuChE du sérum de cheval obtenue, en 1973, par LEE & HARPST, par l'implication possible de la BuChE dans le métabolisme des lipoprotéines circulantes (KUTTY et al. 1973 et 1977), mais également par les travaux concernant différentes acétylcholinestérases. GRAFIUS et al. (1971) ont en effet suggéré que les formes lourdes de l'AChE d'Electrophorus electricus résulteraient de l'interaction entre des monomères et une matrice lipoprotéique. Cette notion a été reprise, en 1972, par DUDAI et al., mais surtout développée par RIEGER et al. (1973a et 1973b) et MASSOULIE et al. (1975) qui reconnaissent la possibilité d'association de l'enzyme native avec des phospholipides. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'AChE érythrocytaire par

BURGER et al. (1968) et SIHOTANG (1976). La récente démonstration, par BEAUREGARD & ROUFOGALIS (1977), du rôle modulateur de l'activité enzymatique exercé par le cardiolipine fortement associé à l'ACHé érythrocytaire, constitue une découverte capitale dans la biochimie des acétylcholinestérases.

3.1. Principe .

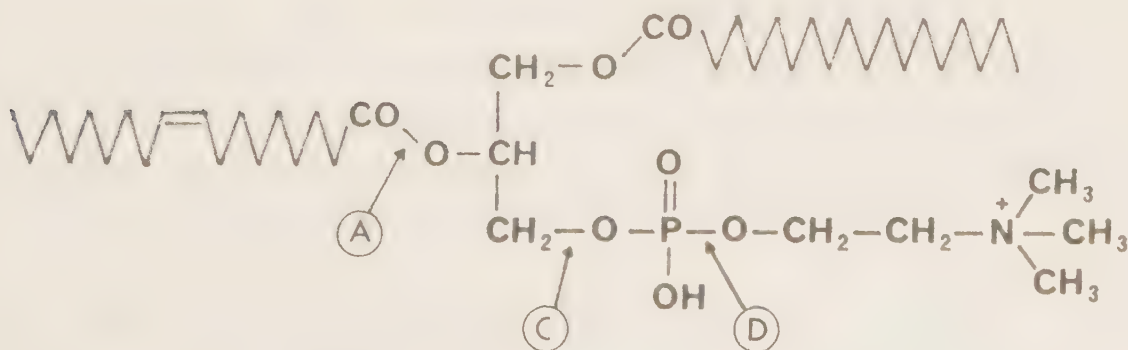
Les trois groupes d'enzymes agissent sur les phospholipides en des points précis :

- La phospholipase A_2 (phosphatidylacyl-hydrolase, E.C.3.1.1.4.) hydrolyse la liaison ester située en β et libère l'acide gras insaturé qui est, le plus souvent, l'acide oléique.

- La phospholipase C (phosphatidylcholine-cholinephosphohydrolase, E.C.3.1.4.3.) agit au niveau de la liaison phosphoester située en α et libère le diglycérade ainsi que la base phosphorylée.

- La phospholipase D (phosphatidylcholine-phosphatidohydrolase, E.C.3.1.4.4.) n'agit que sur les lécithines, c'est-à-dire les glycérophospholipides dont la base est la choline. L'acide phosphatidique et la base sont libérés au cours de cette action.

Le schéma suivant indique les points d'attaque des trois enzymes sur une phosphatidylcholine.



Dans l'hypothèse où un phospholipide jouerait effectivement un rôle dans la cohésion ou la stabilisation des sous-unités, son hydrolyse sous l'action des phospholipases devrait provoquer au

niveau de la structure des différentes formes des changements facilement détectables par des modifications de l'activité ou du comportement électrophorétique. Les activités ont été mesurées au pH-stat et les électrophorèses pratiquées dans les conditions habituelles, à T = 8 ° et en gradient de polyacrylamide sur plaques GRADIPORE.

3.2. Phospholipase A₂

Trois phospholipase A₂, d'origine reptilienne, ont été utilisées :

- Phospholipase A₂ extraite du venin de Bitis gabonica (fournie par le Médecin en Chef NICOLI de l'Institut de Médecine Tropicale de MARSEILLE).
- Phospholipase A₂ du venin de Naja naja (Sigma) lyophilisée titrant 700 U/mg de préparation.
- Phospholipase A₂ du venin de Crotale (Boehringer Mannheim) en solution dans du glycérol à 50 %, titrant 200 U/mg/ml

Ces enzymes ont été employées selon les modalités suivantes:

3.2.1.- Phospholipase A₂ de Bitis gabonica

Cette enzyme, de purification grossière et dont l'activité spécifique ne nous a pas été communiquée, a été utilisée dans des manipulations préparatoires.

Chaque prise d'essai de sérum (100, 250, 500 et 1000 µl) a été mise à incuber en présence de 1 mg de préparation enzymatique pendant des durées croissantes (1 h 30, 3 h 30, 6 h et 24 h), à 20°C.

3.2.2.- Phospholipase A₂ de Naja

L'enzyme a été mise en solution dans NaCl 9 %. tel que l'on ait une préparation titrant 5000 U/ml. Le sérum a été traité par des concentrations d'enzyme de 5, 50 et 500 U/ml, dans les mêmes conditions que l'essai précédent.

3.2.3.- Phospholipase A₂ de Crotale

Le sérum a été traité de façon analogue, mais avec des quantités d'enzymes de 2, 20 et 200 U/ml.

3.3. Phospholipase C .

Nous avons fait appel à des enzymes bactériennes provenant de deux espèces différentes :

- la Phospholipase C de Clostridium welchii (Sigma, type I), titrant 7,4 U/mg de préparation lyophilisée;
- la Phospholipase C de Bacillus cereus (Boehringer Mannheim) en suspension dans le sulfate d'ammonium 3,2 M, titrant 400 U/mg, soit 800 U/ml.

3.3.1.- Phospholipase C de Cl.welchii

L'enzyme de Clostridium welchii a été mise en solution dans 2 ml de NaCl 9 % stérile, telle que l'on ait une activité de 12,5 U/ml. Le sérum a été mis en présence de 2,5 U d'enzyme par millilitre, pendant des temps d'incubation de 1, 3, 6 et 24 heures, à 20°C.

3.3.2.- Phospholipase C de B.cereus

Certains auteurs ont remarqué (SHILOACH et al.1973) que l'activité de la phospholipase C de B.cereus est plus faible que celle des autres germes; aussi, nous avons traité le sérum par de plus fortes activités que précédemment. Un millilitre de sérum a été traité par 4, 8 ou 16 U d'enzyme, pendant des temps de 1, 3, 6 et 24 heures, à 20°C.

3.4. Phospholipase D .

Nous avons utilisé la phospholipase D (Sigma, type I) extraite des chloroplastes de chou, titrant 17,1 U/mg de préparation.

Le traitement du sérum par cette enzyme a été pratiqué selon trois modalités.

3.4.1.- Action de l'enzyme directement sur le sérum

Un millilitre de sérum a été mis à incuber à 20°C, en présence de 0,4; 4 et 10 U d'enzyme, pendant 3, puis 24 heures.

3.4.2.- Action de l'enzyme à pH 6,2

Le sérum a été préalablement dialysé 24 heures contre un tampon phosphate 0,067 M, pH 6,2, puis traité par 0,4 ou 4 U d'enzyme/ml. Les temps d'incubation ont été de 1, 3, 6 et 24 heures à 20°C.

3.4.3.- Action de l'enzyme dans les conditions optimales (KATES & SASTRY, 1969)

Le pH optimum de la phospholipase D de chou se situant entre 5,6 et 5,8, on a amené le sérum à un pH de 5,7 par HCl 0,1 N. Enfin, afin d'être dans les conditions d'activation maximum, 40 mM de Ca^{++} , sous forme de chlorure de calcium (4,4 mg/ml), ont été ajoutées. On a ensuite mis à incuber 1 ml de sérum en présence de 4 U d'enzyme, 24 heures, à 37°C.

3.5. Recherche des protéases dans les préparations enzymatiques utilisées.

Nous avons recherché la présence éventuelle de protéases pouvant contaminer les préparations de phospholipases, en mesurant leur activité hydrolytique vis-à-vis de l'ester éthylique de la N- α -benzoyl-L-arginine (BAEE).

3.5.1.- Principe

Un grand nombre de protéases : la trypsine, la papaïne, la thrombine, la subtilisine, etc.... hydrolysent le BAEE. Dans l'eau, ce substrat présente un maximum d'absorption à 227 nm;

Le spectre de son produit d'hydrolyse, la N- α -benzoyl-L-arginine, déplacé vers les grandes longueurs d'onde est centré sur 254 nm . Le principe du dosage de l'activité protéasique est basé sur la mesure de la variation d'absorbance à 254 nm (BERGMEYER, 1965, pp. 815-818).

3.5.2.- Réactifs

. Tampon TRIS 0,05 M; pH : 8

- TRIS ----- 6,057 g
- HCl 2 N ----- 15 ml
- Eau distillée q.s.p. ----- 1000 ml

. Solution de substrat 0,001 M

- BAEE (Serva) ----- 34,29 mg
- Tampon ----- 90 ml
- CaCl₂ à 5 % ----- 4,44 ml
- Tampon q.s.p. ----- 100 ml

Cette solution conservée à + 4°C reste stable une quinzaine de jours.

3.5.3. Mode opératoire

Nous avons utilisé un spectrophotomètre à double faisceau BECKMAN DK2A positionné sur 254 nm, des cuves en quartz d'un parcours optique de 1 cm et opéré à la température du laboratoire.

On introduit successivement dans les cuves

Solutions (ml)	Blanc	Essai
Substrat	3	3
Eau distillée	0,2	0
Tampon	0	0,18
Echantillon	0	0,02

Après agitation, on déclenche le dispositif cinétique et on laisse la réaction se poursuivre quelques minutes.

L'activité protéasique exprimée en $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ dans la préparation de phospholipase est donnée par la relation :

$$\text{Act} = \frac{\Delta A_{254} / \text{min}}{0,359 \times 0,02}$$

RESULTATS

CHAPITRE I

MISE EN EVIDENCE DE L'HETEROGENEITE MOLECULAIRE

1. ELECTROPHORESE ANNULAIRE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE .

L'électrophorèse annulaire en gel de polyacrylamide à T = 8 % du sérum ou du plasma humain frais, pratiquée sur 60 minutes, nous a révélé, dans la majorité des cas, quatre formes (fig.1) que nous avons désignées par ordre de mobilité décroissante, C₁, C₂, C₃ et C₄, selon la nomenclature de HARRIS et al. (1963).

Les mesures densitométriques pratiquées sur des échantillons de sérum et de plasma nous ont permis d'attribuer à chaque forme une activité relative, exprimée en pourcentage de l'activité totale avec un intervalle de confiance à 95 %.

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
Plasma (N = 24)	21,74 $\pm$ 2,11	12,15 $\pm$ 1,38	7,50 $\pm$ 1,14	57,91 $\pm$ 4,16
Sérum (N = 17)	21,38 $\pm$ 1,70	13,34 $\pm$ 1,78	8,77 $\pm$ 1,23	56,47 $\pm$ 3,99

La répartition des activités ne diffère pas significativement entre le sérum et le plasma.

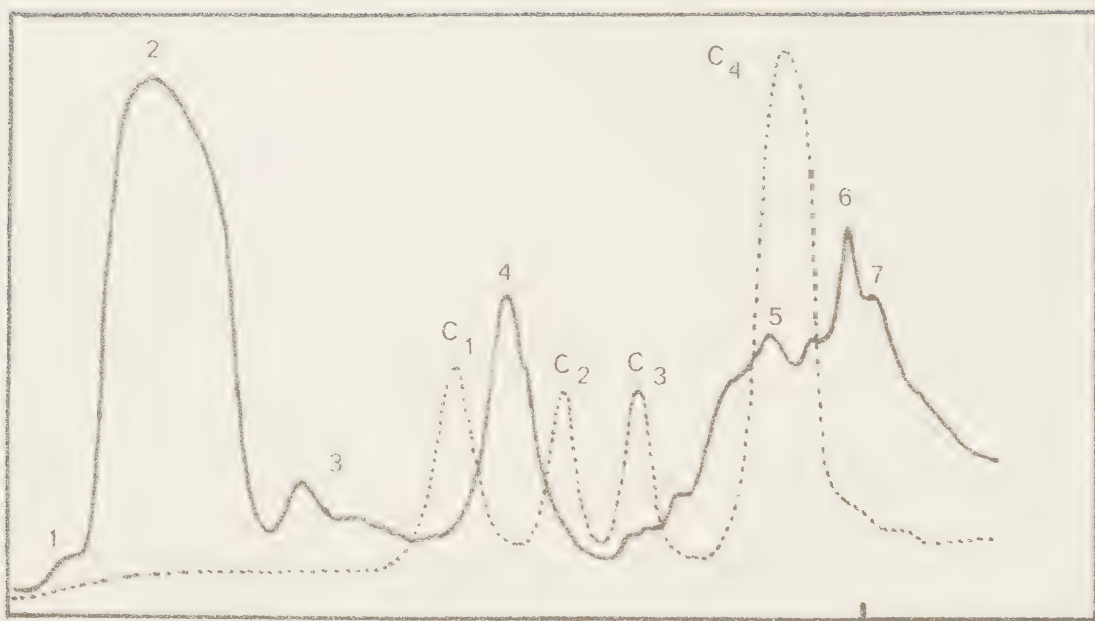


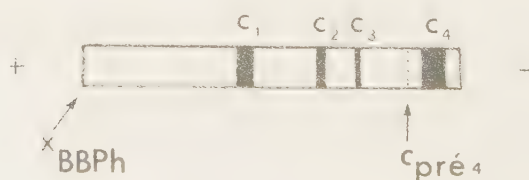
Fig. 1 : Electrophorégramme du sérum humain .

En trait plein, les protéines colorées au Noir amido.

1. Préalbumine
2. Albumine
3. Post-albumines
4. Transferrine et post-transferrine
5. γ -Globulines
6. α_2 -Macroglobuline
7. β -Lipoprotéine

En pointillé, les formes multiples de la BuChE révélées selon la technique de JUUL.

Dans quelques sérums, nous avons observé la présence d'une forme supplémentaire, de faible activité (inférieure à 5 %), située entre C₃ et C₄, que nous avons dénommée C_{pré4} .



Sur des sérums conservés depuis plusieurs semaines au réfrigérateur, nous avons noté d'une part, l'intensification (qui reste

modérée) ou l'apparition de la forme $C_{\text{pré } 4}$ et constaté d'autre part, derrière C_4 , l'apparition de deux nouvelles formes de faible mobilité que nous avons appelées, toutes deux, $C_{\text{post } 4}$



Chez certains individus, et quelles que soient les conditions de l'électrophorèse, les formes C_2 et C_3 nous sont apparues dédoublées.



De façon beaucoup plus rare, il nous est arrivé d'observer un dédoublement des 3 formes rapides C_1 , C_2 et C_3 .

En pratiquant des électrophorèses sur des durées de 2 ou 3 heures, le phénomène de dédoublement de bande se manifeste avec une fréquence plus élevée, y compris sur des sérums pour lesquels il n'apparaît pas en une heure, et concerne même la forme C_4 .

Enfin, sur quelques sérums, une forme de très faible intensité apparaît juste devant C_1 , mais bien en arrière de l'albumine (A).



Donc, aux quatre formes que nous observons de façon permanente, se surajoute une autre hétérogénéité inconstante dont le caractère, en apparence aléatoire, peut être causé par des phénomènes d'interactions entraînant une variation de charge ou de conformation, ou bien lié au vieillissement ou aux conditions de conservation du sérum. Cependant, l'opération après préélectrophorèse afin d'éliminer l'excès de persulfate ou, en l'absence de Bleu de Bromophénol, n'a pas entraîné de modification dans le nombre ou la répartition des

formes. Nous avons donc pu éliminer ces deux causes possibles d'artefacts. Par contre, pour les doublets que l'on observe lors des électrophorèses prolongées, il peut s'agir de formes résultant d'interactions avec des ions ou des molécules du tampon, mais il est également possible que l'on soit en présence de conformères vrais, température-dépendants puisque, par effet JOULE, la température des gels s'élève au cours du temps malgré le système d'autorefroidissement.

2. FILTRATION SUR GEL DE SEPHADEX G-200 .

Après un volume mort de 145 ml, les protéines apparaissent à la 29ème fraction et se séparent en trois pics (Fig. 2) .

Le premier pic, centré sur la 33ème fraction, est constitué par les protéines les plus grosses (β -lipoprotéine, α_2 -macroglobuline). Le second, centré sur la 46ème fraction, comprend des protéines plus légères (γ -globulines....., enfin, le troisième pic, centré sur la 65ème fraction, et plus important que les précédents, est constitué des protéines les plus légères (transferrine, albumine).

L'activité cholinestérasique apparaît dès la 32ème fraction et l'on observe un premier pic intense dont le maximum est situé à la 35ème fraction. Ce pic, légèrement disymétrique, présente deux épaulements sur le versant de droite. Deux autres pics, de plus faible activité, lui succèdent : l'un centré sur la 42ème fraction, l'autre sur la 53ème.

Les fractions n° 35, 42 et 53, concentrées et lyophilisées, ont été ensuite soumises à l'électrophorèse annulaire sur gel de polyacrylamide.

- La fraction 35 s'est révélée constituée, en grande majorité, de la forme C_4 , mais des traces de C_1 et de C_3 sont perceptibles.

- La fraction 42 comporte surtout C_2 et C_3 , mais égale-

ment, en quantité notable, C_4 et une petite activité C_1 .

- Enfin, la fraction 53 n'est pratiquement constituée que de la forme C_1 , mais présente une faible activité C_4 .

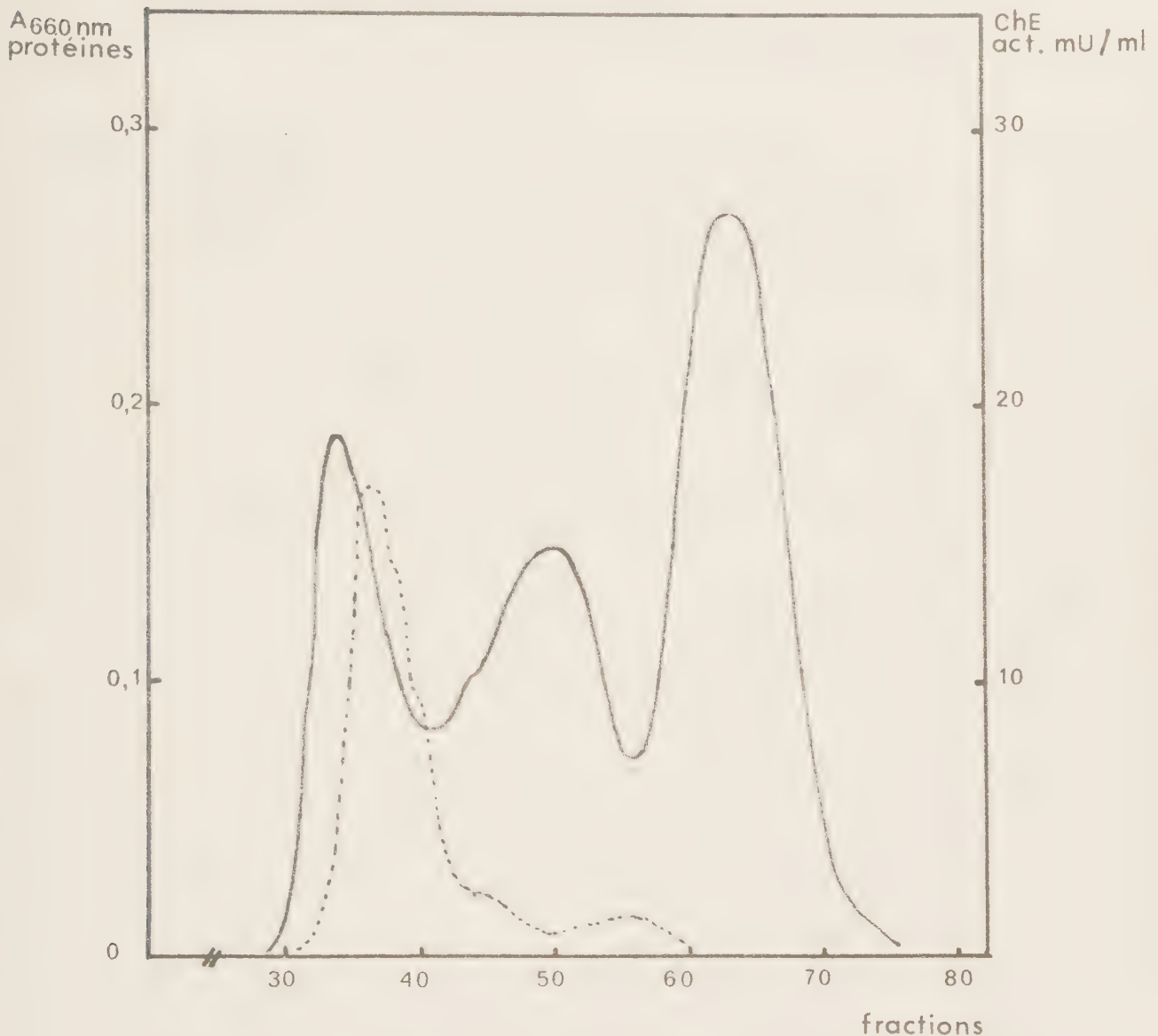


Fig. 2 : Chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex G-200 .

En trait plein, les protéines dosées sur autoanalyseur par la méthode de LOWRY .

En pointillé, l'activité cholinestérasique déterminée par la méthode d'ELLMAN automatisée.

Les résultats de la filtration sur gel nous montrent donc que les quatre formes principales de la BuChE diffèrent dans leur taille et qu'elles doivent s'ordonner selon la séquence :

$$C_4 > C_3 \geq C_2 > C_1 .$$

Les formes C_2 et C_3 , de mobilité électrophorétique voisine et de même volume d'élution, doivent être peu différentes l'une de l'autre mais l'on peut admettre, en vertu des propriétés de tamis moléculaire du gel de polyacrylamide, que $C_3 > C_2$.

Cependant, les résultats de l'électrophorèse des fractions 35, 42 et 53, en faisant apparaître la coexistence de formes de tailles dissemblables, suggèrent qu'une certaine interconvertibilité spontanée est possible.

CHAPITRE II

DETERMINATION DES PARAMETRES MOLECULAIRES

1. MASSSES MOLECULAIRES DES DIFFERENTES FORMES .

Une première détermination des masses moléculaires apparentes des formes C_1 , C_2 , C_3 , C_4 a été pratiquée par la méthode d'HEDRICK & SMITH (1968).

Selon que nous nous sommes référé à la droite d'étalonnage $K_R = f(M)$ établie avec la gamme de protéines globulaires (Fig. 1), ou à celle obtenue avec l'albumine bovine et ses polymères (Fig. 3), les résultats ont été très différents.

Dans les deux séries d'expériences, pour chaque protéine ou sérum, et à toutes les concentrations (T) de gel, les mesures ont été répétées 7 fois, et nous ont permis de tracer les droites d'étalonnage $K_R = f(M)$ avec leurs limites de confiance bilatérales à 95 %.

L'examen des droites qui traduisent la variation de la mobilité relative des 4 formes en fonction de la concentration du gel, est déjà riche d'enseignement (Fig.2).

$$\log R_m = \log R_{m_0} - K_R T$$

L'existence de 4 droites de pentes K_R progressivement croissantes, traduit l'hétérogénéité moléculaire du système et reflète, en particulier, la séquence $C_4 > C_3 > C_2 > C_1$.

Les droites correspondant aux formes C_1 , C_3 et C_4 se coupent en un point ω d'abscisse $T \approx 2,25\%$ qui exprime la relation de parenté devant exister entre elles.

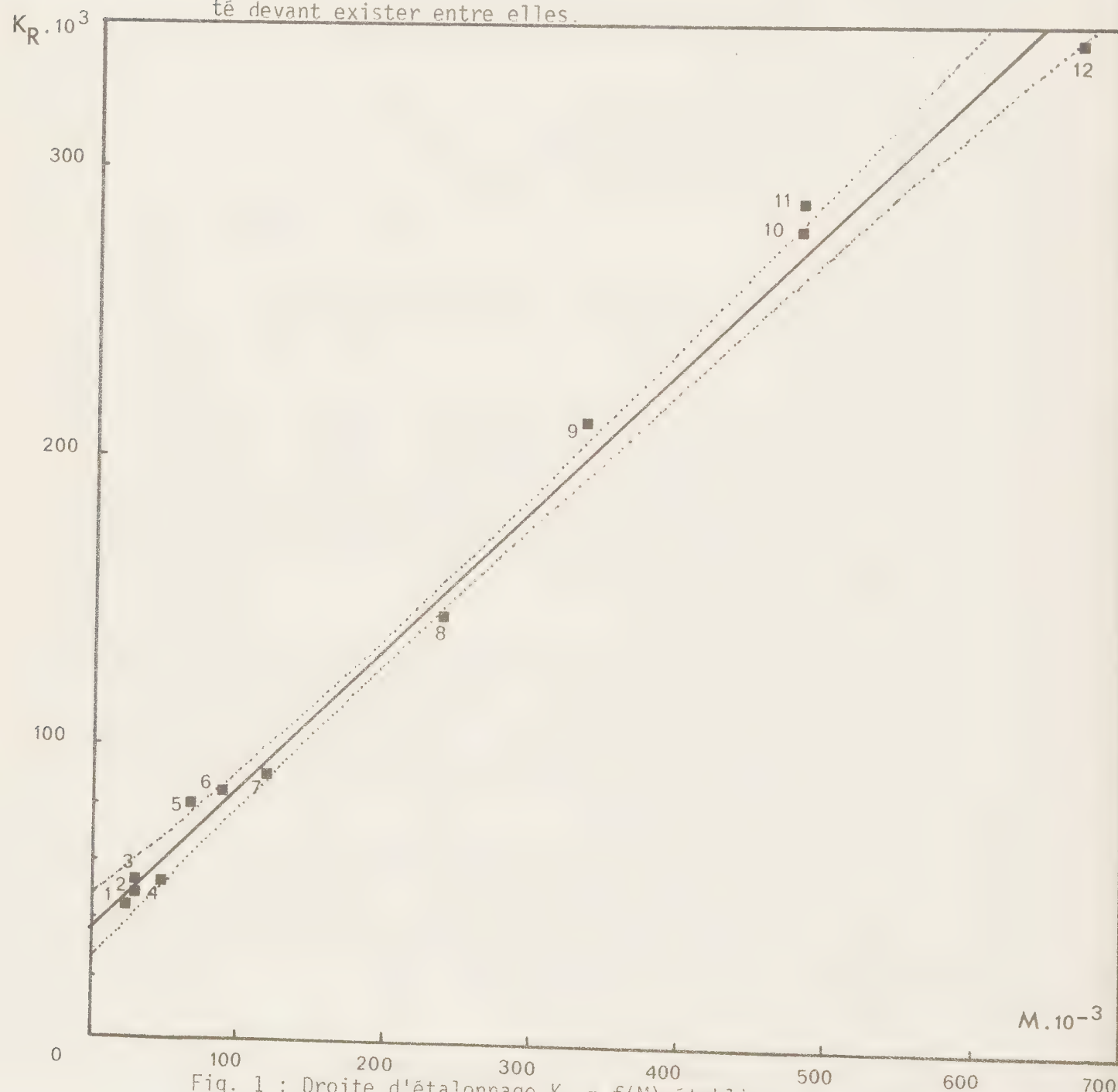


Fig. 1 : Droite d'étalonnage $K_R = f(M)$ établie avec une gamme de protéines globulaires. (Les deux hyperboles tracées en pointillé représentent la limite de confiance pour un intervalle de 95 %).

1. Chymotrypsinogène A, 2. Hémoglobine A (demi-molécule), 3. Ovalbumine, 4. S.A.B., 5. Aldolase (demi-molécule), 6. Transferrine, 7. catalase (demi-molécule), 8. Catalase, 9. Thyroglobuline (demi-molécule), 10. Ferritine, 11. Uréase, 12. Thyroglobuline.

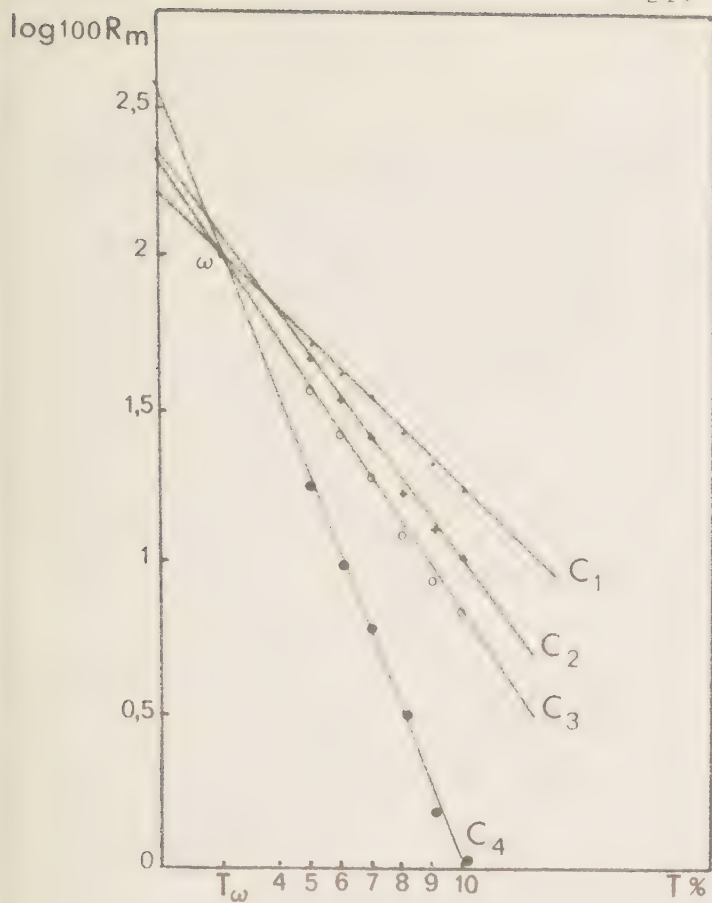
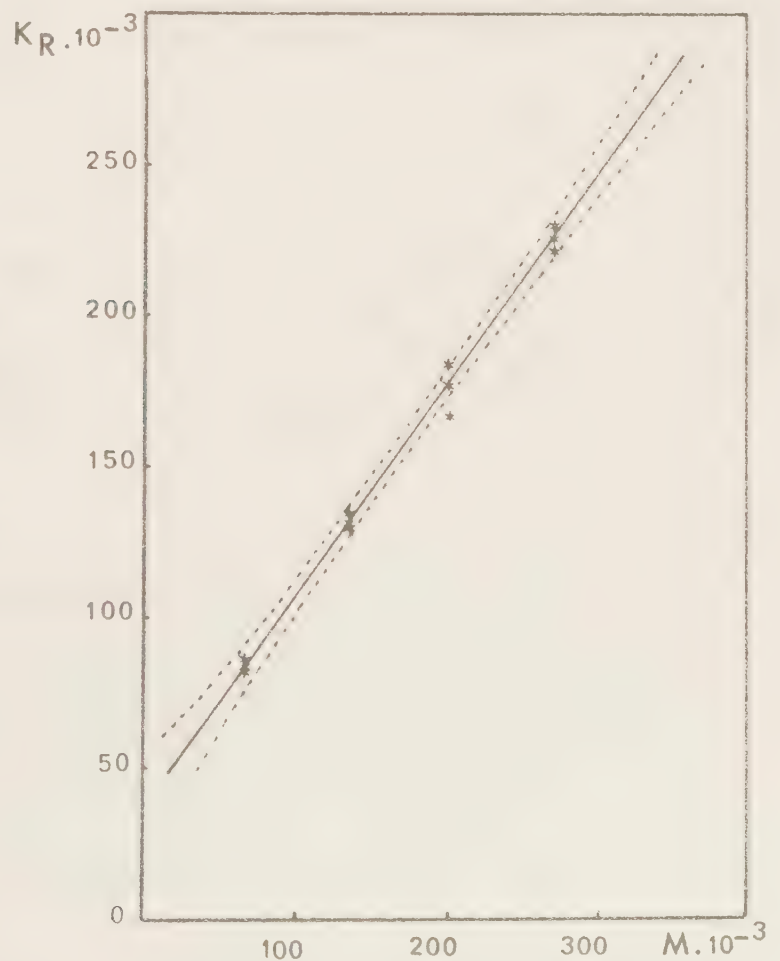


Fig. 2
Mobilité des quatre formes
de la BuChE en fonction de
T % .

$$\text{Log } 100 R_m = f(T)$$

Fig. 3
Droite d'étalonnage
 $K_R = f(M)$ établie avec
les polymères de la SAB.
Les deux hyperboles
tracées en pointillé
représentent la limite
de confiance pour un
intervalle de 95 %.



D'autre part, ces 3 droites déterminent deux angles approximativement égaux ($C_1 \hat{=} C_3 = 12^\circ 21'$ et $C_3 \hat{=} C_4 = 12^\circ 15'$). Or, HEDRICK & SMITH (1968) ont montré que les familles de droites régulièrement espacées, convergeant vers un point commun, d'abscisse T_w , correspondent à une famille d'isomères de taille dont la densité de charges est la même. A la concentration de gel T_w , elles migrent toutes avec la même mobilité.

La forme C_2 exclue de la famille doit en différer par sa densité de charges et par sa nature moléculaire.

	$ K_R $	M apparentes		$\Delta M \cdot 10^{-3}$ entre les deux étalonnages
		Protéines globulaires étalons	S.A.B. et polymères	
C_1	0,097	118000 $\pm$ 8000	86000 $\pm$ 10000	32
C_2	0,138	206000 $\pm$ 4000	146000 $\pm$ 8000	60
C_3	0,151	232000 $\pm$ 4000	164000 $\pm$ 6000	68
C_4	0,257	450000 $\pm$ 16000	314000 $\pm$ 14000	136

Les différences d'estimation des masses moléculaires que l'on constate entre les deux séries demandent réflexion. En effet, elles sont trop significatives pour n'être imputables qu'aux fluctuations normales des résultats expérimentaux. Elles ne peuvent être dues qu'à des effets stériques liés aux différences de géométrie existant entre les protéines globulaires de la première gamme d'étalonnage et les polymères de l'albumine de la seconde.

BARTON (1972) avait déjà observé le comportement "anormal" de la S.A.B. par rapport à une série de protéines globulaires, lors de la détermination des masses moléculaires des protéines capsidaires du virus de la fièvre aphteuse. Le comportement électrophorétique de la S.A.B. et de ses polymères n'est pas en accord direct avec la masse moléculaire. Par rapport aux protéines globulaires, ces protéines apparaissent de taille plus grande.

En fait, on sait que l'albumine bovine ainsi que ses polymères, a une structure allongée. Son rapport axial, de l'ordre de 3,5, est en accord avec celui d'une molécule se présentant sous la forme d'un ellipsoïde de révolution allongée dont le grand axe $2a$ est de 140 Å et le petit axe $2b$ de 40 Å (SQUIRE et al., 1968). On sait par ailleurs que ses polymères apparaissent en microscopie électronique sous l'aspect d'agrégats de sous-unités associées linéairement (SLAYTER, 1965).

Or, si l'on ne connaît pas la valeur des masses moléculaires de C_2 et C_3 , plusieurs auteurs ont déterminé celles de C_1 et de C_4 et leur ont attribué, respectivement, des valeurs de l'ordre de 80000 et 300000. Dans nos expériences, c'est donc l'étalonnage par rapport à l'albumine qui fournit, pour ces deux formes, les résultats les plus en accord avec les données de la littérature. Pour ce qui concerne C_2 et C_3 , il semble que l'étalonnage par rapport à l'albumine soit également celui qui donne les résultats les plus corrects. En effet, si l'on compare les masses moléculaires des formes C_1 , C_3 et C_4 , on constate qu'elles sont en progression géométrique de raison 2. D'autre part, l'étude des droites $\log R_m$ en fonction de T , nous a montré que ces trois formes doivent être des isomères de taille. Il apparaît donc, au vu de cet ensemble de résultats, que la relation de parenté qui existe entre ces trois formes correspond à celle d'une famille monomère-dimère-tétramère.

Quant à la forme C_2 , elle semble très proche de C_3 avec une masse moléculaire plus faible, dont le défaut est de l'ordre de 20000, mais sa mobilité libre relative (R_{m0}) suggère que sa densité de charges négatives est plus grande que celle de C_3 .

Sans aborder la question de la géométrie des formes qui sera traitée dans un des prochains chapitres, on peut toutefois faire remarquer que le comportement électrophorétique des formes de la BuChE suggère qu'elles ont une géométrie analogue à celle de l'albumine et de ses polymères et que cette géométrie doit être peu affectée par le processus d'oligomérisation, en d'autres termes, que les propriétés géométriques de C_4 ne diffèrent pas sensiblement de celles de C_3 et de C_1 .

Il est d'ailleurs intéressant d'observer que les différences moyennes des masses moléculaires ($\Delta\bar{M}$) entre les valeurs calculées par références aux protéines globulaires et les valeurs obtenues à partir des polymères de l'albumine, respectent pour C_1 , C_3 , C_4 , la progression géométrique de ces trois formes.

$$\Delta\bar{M}_{C_4} = 2 \Delta\bar{M}_{C_3} \neq 4 \Delta\bar{M}_{C_1}$$

Une variation de géométrie, c'est-à-dire une transition de la forme allongée à une forme plus globulaire, lors du passage du monomère au dimère ou du dimère au tétramère se serait traduite par une diminution du K_R de l'oligomère supérieur. L'écart $\Delta\bar{M}_{C_4}$, étant toujours un multiple entier de l'écart initial $\Delta\bar{M}_{C_1}$, la géométrie apparaît donc remarquablement constante.

Il est par ailleurs facile de montrer que les mobilités relatives des formes C_1 , C_3 et C_4 constituent une séquence géométrique. La théorie de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide prévoit que les séries de protéines oligomériques dont les sous-unités sont associées linéairement présentent des mobilités "géométriques". Pour ces protéines, les distances de migration de deux oligomères de rang successif sont dans un rapport constant (g) pour T % donné (SCURZI & FISHBEIN, 1973). Les mobilités des protéines globulaires (oligomères compacts) n'obéissent pas à cette loi.

$$g_T = \left(\frac{m_{n+1}}{m_n} \right)_T$$

d'où

$$g^{n-1} = \frac{m_n}{m_1} \quad \text{ou} \quad g^n = \frac{m_n}{m_1/g}$$

(m_1 = mobilité du monomère, n = rang du polymère)

On peut écrire cette relation sous forme logarithmique :

$$\log R_{m_n} = \log R_{m_1}/g + n \log g$$

T%		5	6	7	8	9	10
C ₁	R _m	0,540	0,439	0,363	0,273	0,222	0,180
	log 100 R _m	1,733	1,643	1,559	1,437	1,346	1,256
C ₂	R _m	0,487	0,357	0,263	0,173	0,132	0,104
	log 100 R _m	1,688	1,553	1,421	1,241	1,120	1,018
C ₃	R _m	0,378	0,278	0,196	0,128	0,091	0,071
	log 100 R _m	1,578	1,444	1,292	1,108	0,958	0,852
C ₄	R _m	0,181	0,101	0,061	0,031	0,015	0,0102
	log 100 R _m	1,257	1,005	0,785	0,491	0,176	0,0086

Si l'on forme les quotients des mobilités relatives des espèces C₂, C₃ et C₄ par rapport à C₁, on obtient pour les différentes valeurs de T, les constantes géométriques expérimentales (g_{exp}^{n-1}) de la série. Le rapport des mobilités de C₃/C₁ (dimère/monomère) définit g. Ce nombre élevé au cube est identique, aux erreurs près, à la valeur de g^{4-1} obtenue en formant le rapport des mobilités de C₄/C₁ (tétramère-monomère).

Donc, les formes C₁, C₃ et C₄ de la BuChE du sérum humain représentent une série de polymères dont les sous-unités sont en apparence associées linéairement.

Valeur de la constante géométrique g aux différentes concentrations T

T	5	6	7	8	9	10
$\frac{R_m C_2}{R_m C_1}$ n < 2	0,901	0,813	0,724	0,633	0,593	0,577
$g_{\text{exp}}^{n-1} = \frac{R_m C_3}{R_m C_1}$ n = 2	0,700	0,633	0,539	0,468	0,409	0,395
$\frac{R_m C_4}{R_m C_1}$ n = 4	0,334	0,230	0,167	0,114	0,067	0,056
$g_{\text{théor}}^3 = \left(\frac{R_m C_3}{R_m C_1} \right)^3$	0,343	0,253	0,156	0,102	0,068	0,061
Erreur % = $\frac{g_{\text{exp}}^3 - g_{\text{théor}}^3}{g_{\text{théor}}^3}$	-2,6	-9,1	+7,0	+11,8	-1,5	+8,2

Enfin, il nous a été possible d'estimer les masses moléculaires des formes observées de façon plus rare.

	$ K_R $	M par rapport au système S.A.B.	
$C_{\text{pré } 1}$	0,0789	60000	$\pm$ 12000
$C_{\text{pré } 4}$	0,178	204000	$\pm$ 8000
$C_{\text{post } 4} \begin{cases} A \\ B \end{cases}$	0,267	328000	$\pm$ 15000
	0,285	352000	$\pm$ 18000

La forme $C_{\text{pré } 1}$, observée de façon tout à fait exceptionnelle, apparaît de taille plus petite que le monomère C_1 .

$C_{\text{pré } 4}$, avec une ordonnée à l'origine (R_{m0}) de 1,838, a une densité de charges beaucoup plus faible que les autres formes. Par ailleurs, sa variation de mobilité en fonction de T l'exclut de la famille C_1, C_3, C_4 et sa masse moléculaire est incompatible avec celle d'un trimère de C_1 . Cette forme peut donc être considérée comme un produit de dégradation du tétramère C_4 ou une protéine hybride entre une des formes légères (C_1, C_2 ou C_3) et une protéine étrangère faisant fonction de transporteur.

Les deux formes $C_{\text{post } 4}$ qui apparaissent au cours du vieillissement ne semblent pas identiques. La forme A, dont la masse moléculaire ne diffère passignificativement de C_4 , peut être un conformère de celle-ci ou une espèce légèrement modifiée. Par contre, la forme B, si elle provient réellement de C_4 , doit avoir subi une modification plus profonde.

Les résultats qui ont été obtenus par électrophorèse en gradient de polyacrylamide, selon la méthode de MARGOLIS & KENRICK (1968), s'ils sont légèrement supérieurs aux précédents, les confirment cependant.

Pour un lot de gels GRADIPORE donné, la précision de la méthode est liée aux erreurs de mesure des distances de migration des protéines. Pour tous les polymères de l'albumine, l'intervalle de confiance à 95 % des distances moyennes mesurées (x) est de ± 1 mm. A partir de ces valeurs, nous avons tracé la droite d'étalonnage $\log M = f(x)$ (Fig. 4) et déterminé les masses moléculaires apparentes des formes de la BuChE.

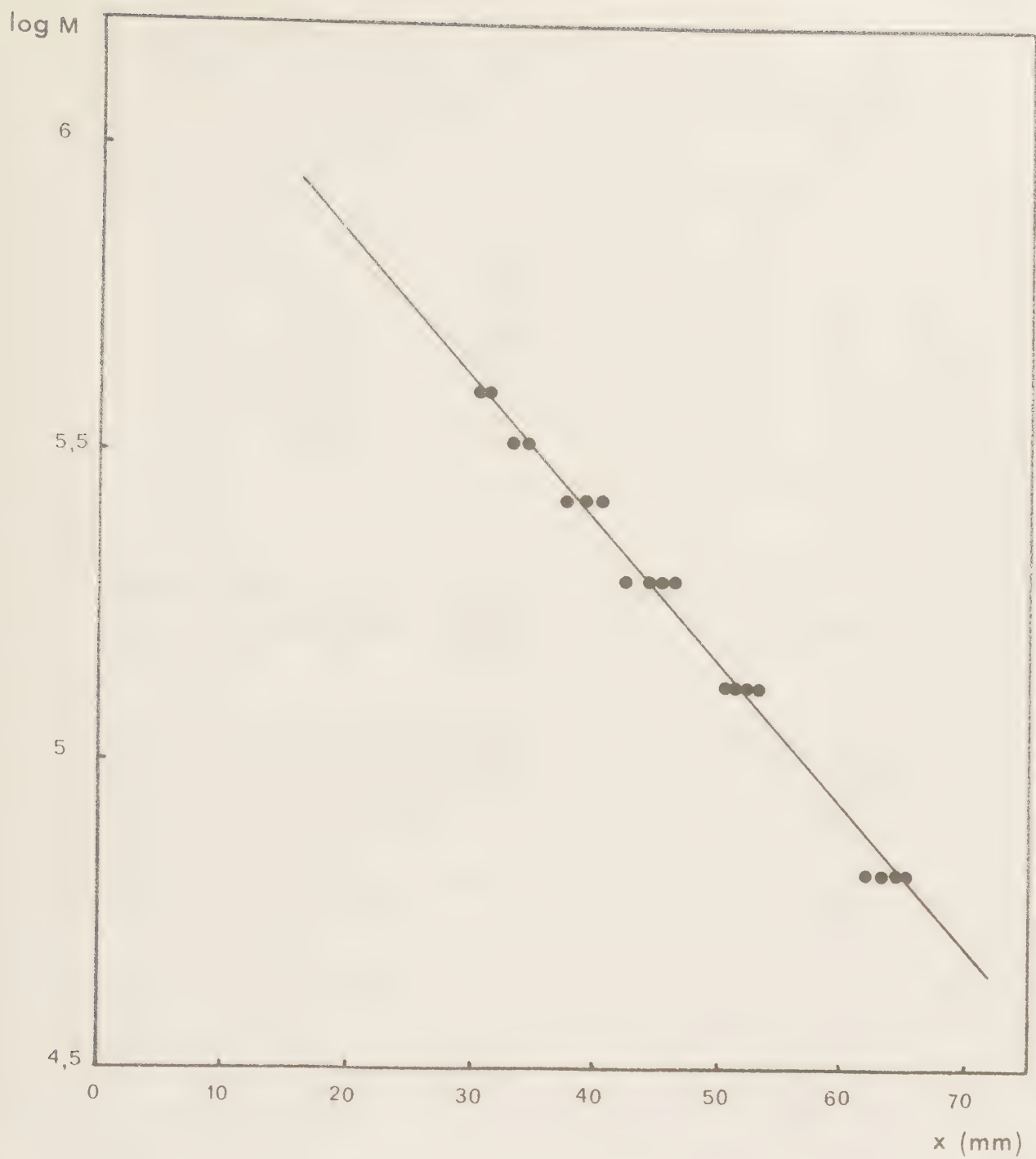


Figure 4. - Droite d'étalonnage (S.A.B. et polymères): $\log M = f(x)$

Les 10 essais pratiqués nous ont donné les résultats suivants (intervalle de confiance à 95 % pour 9 d.d.l et $t = 2,262$).

	M		
C ₁	88900	±	7800
C ₂	150000	±	5000
C ₃	181000	±	4000
C ₄	370000	±	20000

La masse moléculaire C_{pré 4} a été estimée à 280000 ± 17000; c'est le seul résultat qui soit divergent des précédents.

Cette technique d'électrophorèse en gradient d'acrylamide a eu cependant l'avantage de nous révéler une forme supplémentaire, que nous ne pouvions détecter par électrophorèse annulaire et qui, bien que présentant une activité négligeable, de l'ordre de 1-2 %, est parfaitement visible sous forme d'un doublet très fin et très étroit, situé derrière C₄.

Lorsqu'on superpose l'électrophorégramme des protéines du sérum colorées au Noir amido avec celui des formes multiples de la BuChE révélées par la méthode de JUUL, le doublet de l' α_2 -macroglobuline coïncide avec le doublet d'activité cholinestérasique situé en arrière de C₄ (Fig. 5). Il y aurait donc fixation ou transport d'une des formes de l'enzyme par l' α_2 -macroglobuline.

Nous estimons la masse moléculaire de ce doublet à 930000 ± 50000 (l'intervalle de confiance est très large car nous sommes dans la zone du gradient où une erreur de mesure, si faible soit-elle, a d'importantes conséquences sur l'estimation de M). Or, la masse moléculaire de l' α_2 -macroglobuline humaine est de 820000.

Nous formulons l'hypothèse que la différence de masse moyenne, de l'ordre de 110000, que l'on observe peut être due à la fixation d'une molécule de C_1 ainsi que d'autres protéines de tailles plus petites sur une molécule d' α_2 -macroglobuline qui assure leur transport ou qui interagit avec elles de façon plus ou moins spécifique.

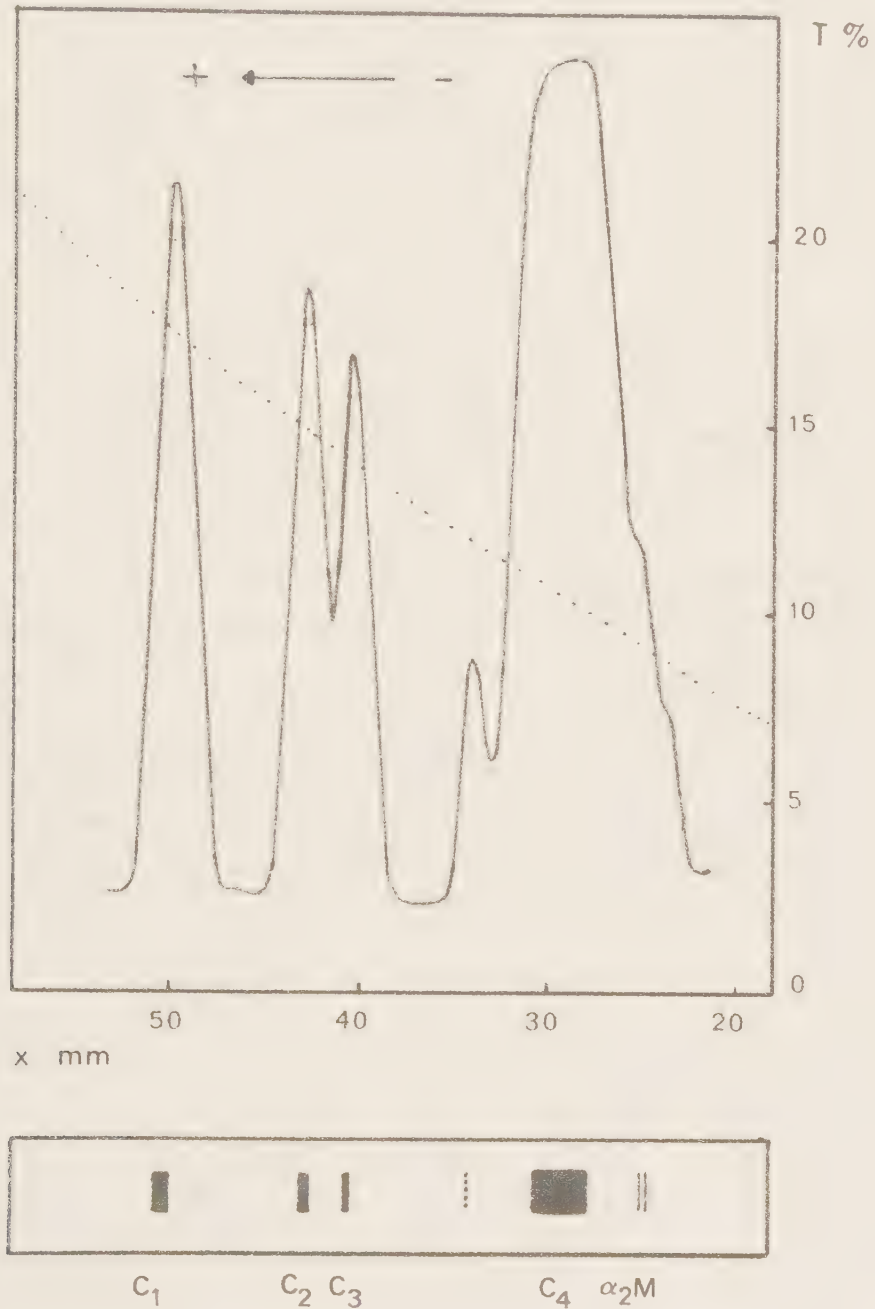


Fig. 5 : Electrophorégramme de la BuChE sur gel GRADIPORE.
En trait plein, l'intensité relative des différentes formes .
En pointillé, la variation de la concentration du gel en
fonction de la distance.

Les déterminations effectuées par la méthode de MANWELL (1977) nous ont fourni des résultats du même ordre de grandeur . Cependant, par suite de sa grande mobilité, la forme C_2 apparaît avec une masse légèrement supérieure à celle qui est attendue .

	M		
C_1	76000	$\pm$	10000
C_2	147000	$\pm$	15000
C_3	147000	$\pm$	5000
C_4	318000	$\pm$	30000

Cette technique récente présente à nos yeux un double intérêt : à côté de la détermination des masses moléculaires, elle permet d'estimer la mobilité électrophorétique comme nous l'avons mis en pratique (MASSON, 1978). Par ailleurs, les tracés des droites $1/x = f(1/t)$ font ressortir le caractère de parenté des formes C_1 , C_3 et C_4 et l'exclusion de C_2 de cette famille (Fig. 9) de la même façon que les diagrammes de FERGUSON (Fig.2). On retrouve pour les formes C_1 , C_3 , C_4 la même convergence vers un point ω observé avec les polymères de la sérum albumine bovine. Nous aurons l'occasion de revenir sur ces diagrammes lors de l'étude de la mobilité électrophorétique et lorsque nous tenterons de corrélérer les paramètres moléculaires aux paramètres géométriques de l'enzyme.

Fig. 6 : Plaque GRADIPORE

Variation de la concentration d'acrylamide en fonction de la distance :

$$T = f(x)$$

$$T = ax^2 + bx + c$$

$$x > 0$$

$$a \approx 0,4$$

$$b \approx 1,2$$

$$c \approx 3,3$$

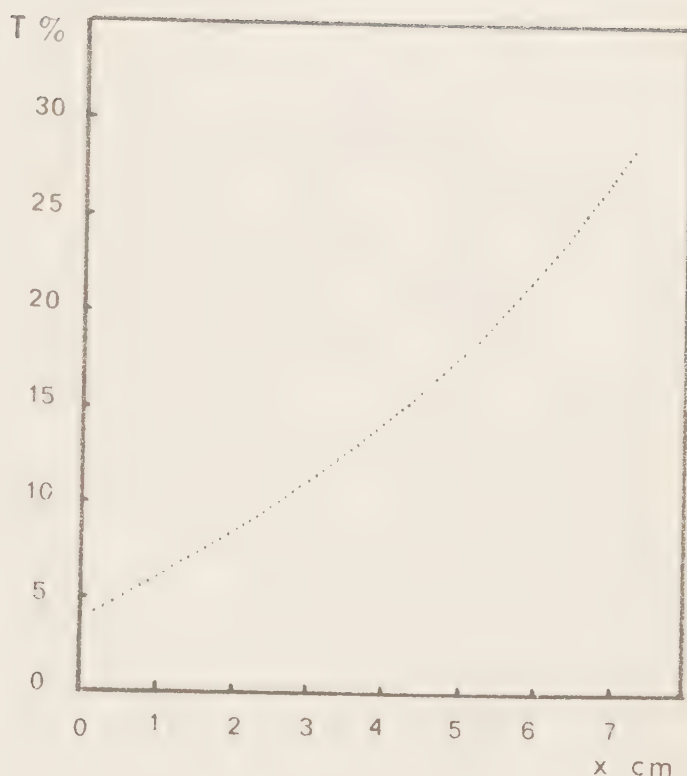


Fig. 7 : Plaque GRADIPORE

$$\log T = f(x)$$

Le gradient d'acrylamide étant concave, la variation de la concentration peut être représentée par deux droites.

Pour $x < 2,8$ cm, on se réfère à la droite A, pour les distances supérieures, à la droite B.

Droite A

$$\log T = 0,172 x + 0,517$$

Droite B

$$\log T = 0,0949 x + 0,759$$



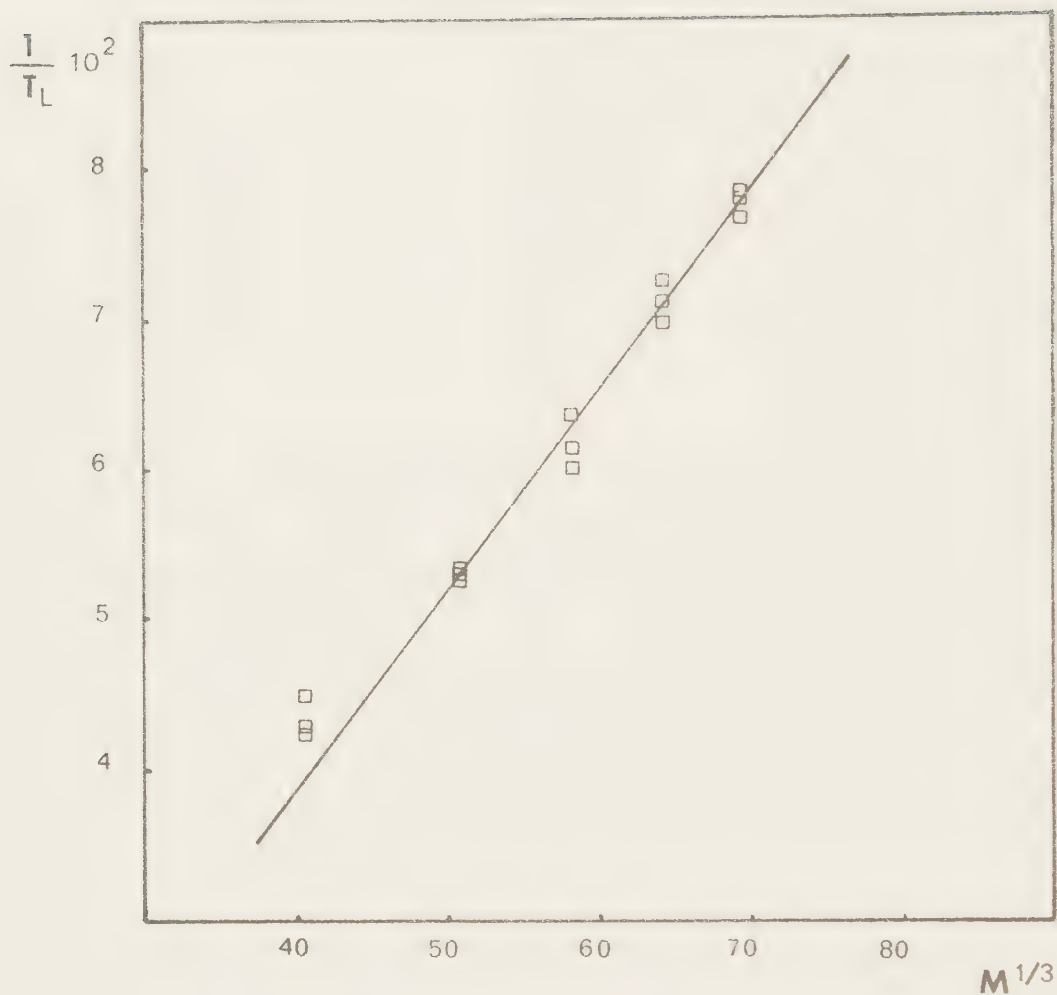


Fig. 8 : Méthode de MANWELL

Droite d'étalonnage $1/T_L \cdot 10^2 = f(M^{1/3})$ tracée à partir des valeurs de T_L de chaque polymère de la sérum albumine bovine. Les concentrations limites d'acrylamide (T_L) ont été calculées en utilisant la formule : $\log T_L = 0,0949 x_L + 0,759$.

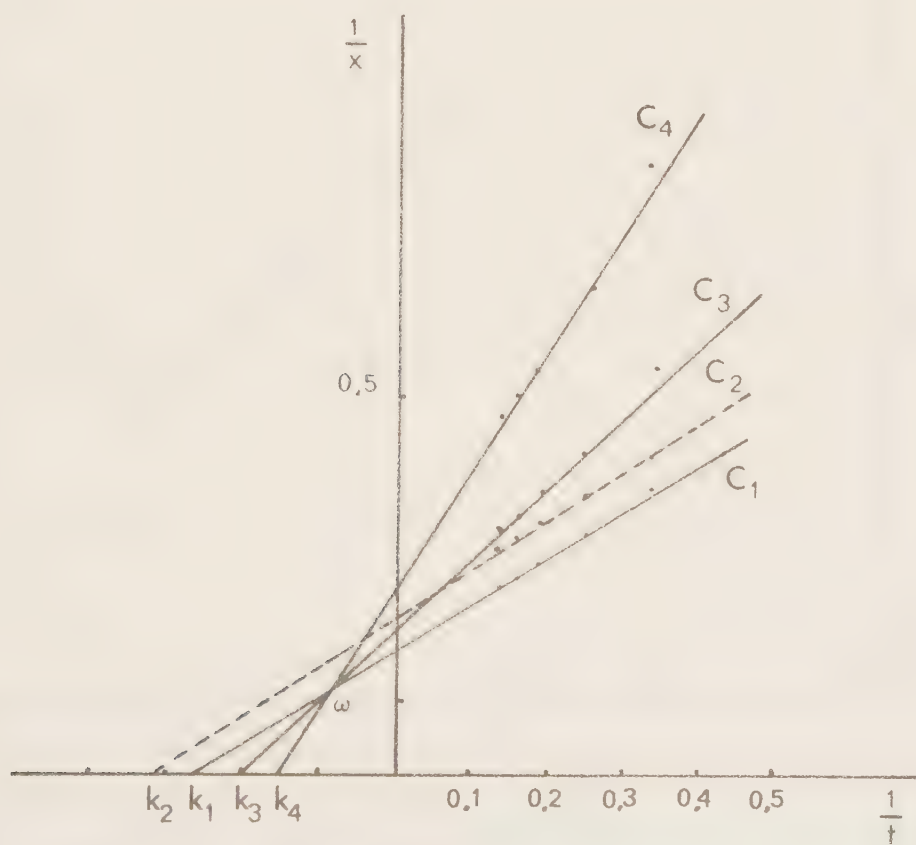
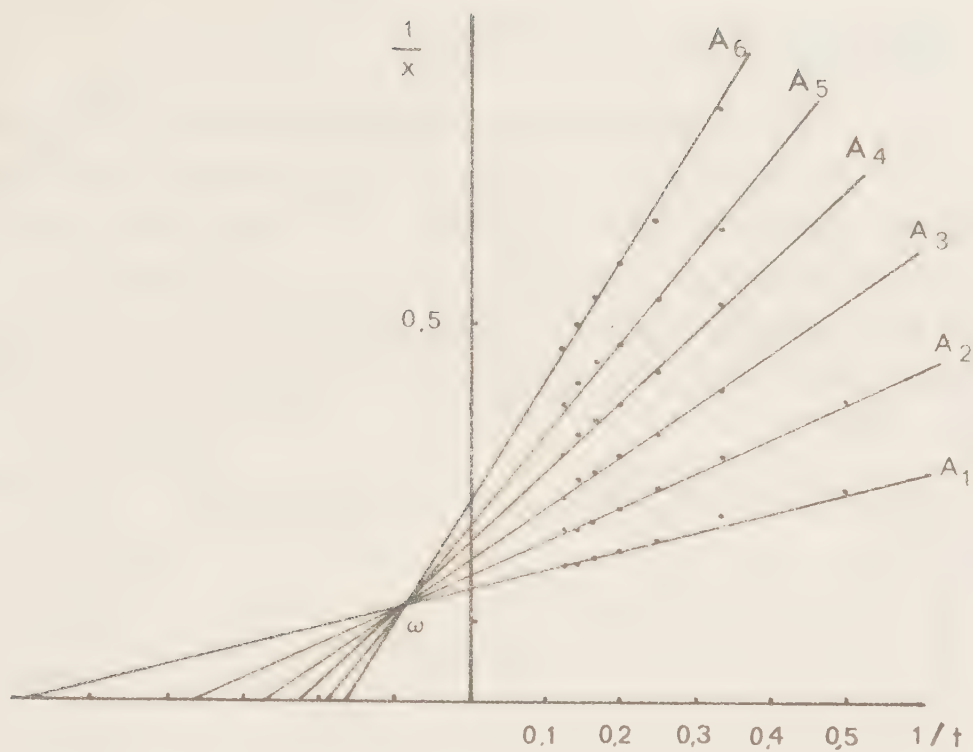


Fig. 9 : Méthode de MANWELL - Familles de droites $\frac{1}{x} = \frac{1}{kx_L} \cdot \frac{1}{t} + \frac{1}{x_L}$

Figure supérieure : système des polymères de la S.A.B.

Figure inférieure : les quatre formes de la BuChE.

2. MASSE MOLECULAIRE DU MONOMERE .

Par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium et de β -mercaptoéthanol, après renaturation, nous n'avons mis en évidence qu'une seule forme dont nous avons pu déterminer la masse moléculaire en reportant ses R_m , mesurés expérimentalement, sur la droite d'étalonnage $R_m = f(\log M)$ établie avec une série de protéines traitées dans les mêmes conditions (Fig. 10).

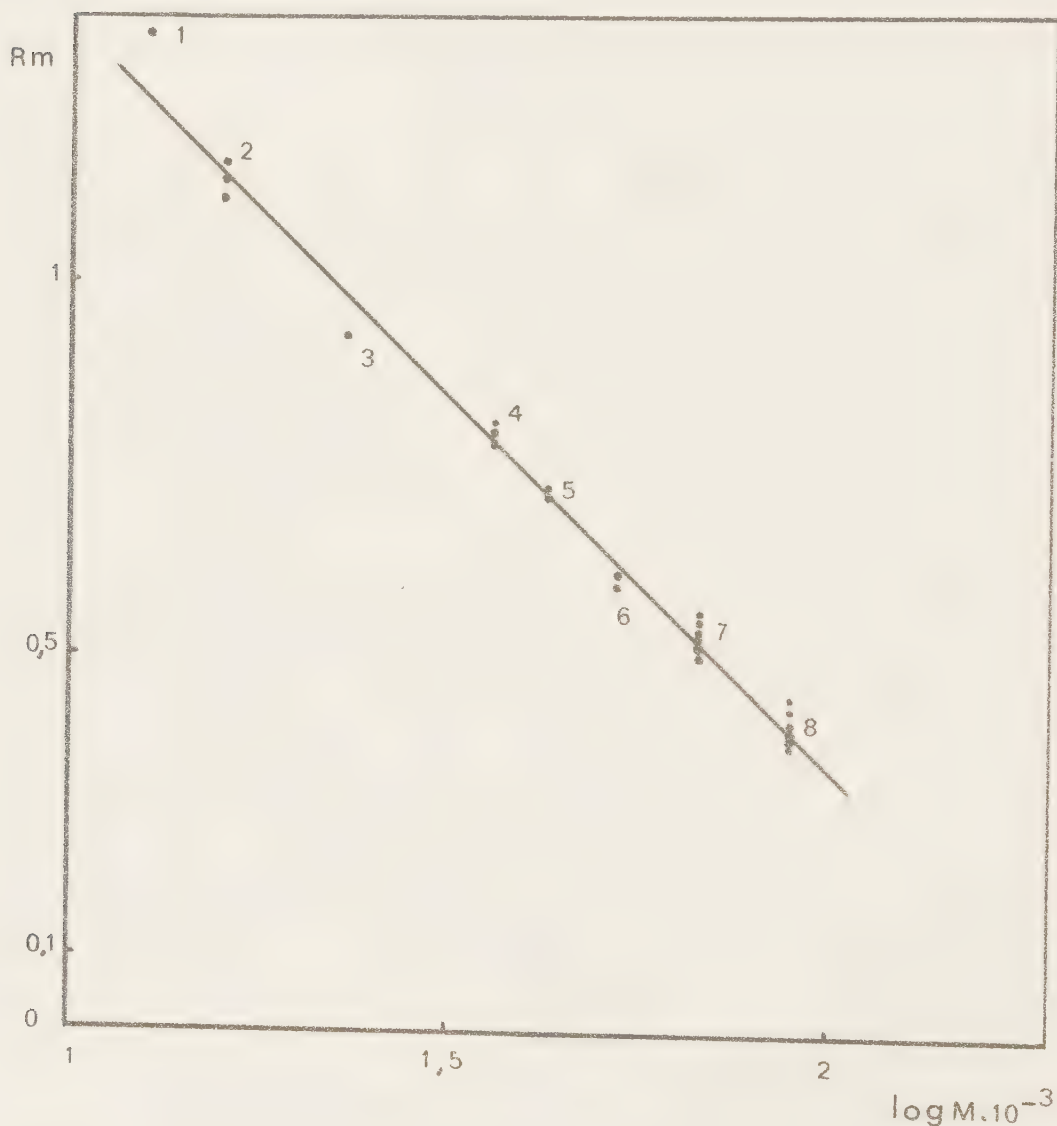


Fig. 10 : Droite d'étalonnage $R_m = f(\log M \cdot 10^{-3})$ à $T = 5\%$.

1 : Cytochrome c, 2 : Hémoglobine A (monomère), 3 : IgG chaîne L,
 4 : Alcool deshydrogénase, 5 : Ovalbumine, 6 : IgG chaîne H,
 7 : S.A.B., 8 : Transferrine .

Le calcul de la masse moléculaire moyenne effectué sur 11 déterminations, nous a autorisé, en pratiquant le test t de STUDENT, à lui assigner un intervalle de confiance à 95 %, tel que :

$$M = 84800 \pm 5800$$

Cette valeur de M est en accord avec la masse moléculaire de C_1 et suggère que celle-ci représente la sous-unité monomérique de base constitutive des autres formes de la BuChE.

Cependant, ce résultat ne nous permet pas d'exclure la possibilité d'existence d'un monomère muet qui, en s'associant au monomère actif (C_1), engendrerait les formes de rang supérieur. En fait, les droites $\log R_m = f(T)$ que nous avons tracées précédemment (HEDRICK & SMITH) (Fig. 2), en convergeant vers un point commun ω , signifiaient que les formes C_1 , C_3 et C_4 étaient des isomères de tailles, multiples d'une même sous-unité.

En admettant qu'un monomère muet puisse exister à côté de C_1 , sa structure globale en serait très voisine, sinon identique, et la seule vraie différence serait d'ordre fonctionnel, c'est-à-dire, qu'elle ne concernerait que le centre actif. Les formes d'ordre supérieur C_3 et C_4 seraient, dans cette hypothèse, des hybrides. Or, on sait que de tels hybrides existent et sont représentés par les variants allélomorphes.

Pour les formes C_3 et C_4 , notre hypothèse est donc absurde puisque l'enzyme normale est uniquement codée par le gène E_1^u .

Par contre, pour C_2 , elle est plausible. Cette forme ne fait pas partie de la famille des isomères de taille; pourtant, elle contient la sous-unité de masse 84800. La différence entre sa masse moléculaire et la masse de cette sous-unité est trop faible pour qu'il s'agisse du monomère, et les questions qui se posent sont de savoir si cette seconde sous-unité est muette ou active, s'il s'agit d'une protéine dérivée de C_1 par modification épigénétique ou bien s'il s'agit d'une protéine différente.

Pour le moment, on ne peut répondre à ces questions ; cependant, à côté de la forme monomérique, lorsqu'il nous est arrivé d'opérer sur des sérums conservés depuis plus d'une semaine au réfrigérateur, nous avons observé, de façon inconstante (5 fois sur 11), une forme de masse moléculaire plus faible que nous estimons de $M = 51800 \pm 5300$.

Il est tentant de voir en cette forme, la 2ème sous-unité de C_2 qui serait donc active. Mais comment se fait-il qu'elle n'apparaisse pas dans le sérum frais ? S'il peut, effectivement, s'agir de la 2ème sous-unité de C_2 , cette forme peut aussi être un produit de dégradation de l'enzyme dérivé des formes $C_{pré 4}$ ou $C_{nost 4}$ engendrées au cours du vieillissement, ou encore s'apparenter à cette forme $C_{pré 1}$ que nous avons observée de façon exceptionnelle.

Dans la pratique de l'électrophorèse en présence de SDS, on ajoute au milieu du β -mercaptoéthanol pour rompre les ponts disulfures intracaténaires, afin d'assurer aux complexes polypeptide-SDS un comportement électrophorétique normal, c'est-à-dire uniquement fonction de leur longueur.

Dans le cas des protéines oligomériques à structure quaternaire covalente, le β -mercaptoéthanol participe, aux côtés du SDS, à la dissociation des sous-unités, en rompant les ponts disulfures interchaînes.

Donc, l'expérience précédente ne nous permet pas d'affirmer que les sous-unités monomériques qui constituent les formes C_2 , C_3 et C_4 soient uniquement liées par des liaisons électrostatiques et/ou hydrophobes, car les ponts disulfures peuvent également participer à leur cohésion.

Dans une série d'expériences, nous avons donc omis l'agent réducteur lors de la préparation des étalons et des échantillons, ainsi que dans le tampon d'électrophorèse. Au niveau des protéines étalons, on constate alors que la mobilité relative n'est plus une fonction linéaire de la masse moléculaire, mais suit une loi exponentielle.

Dans le sérum, nous n'avons non plus observé une forme, mais plusieurs. Cependant, étant donné les courtes distances de migration et le chevauchement des activités parfois sur deux ou trois tronçons de gel, il nous a été impossible d'estimer leur masse moléculaire; néanmoins, une première zone semble correspondre à C_1 , un massif assez diffus à C_2 et C_3 réunis, et enfin, une troisième zone à C_4 .

Ces résultats suggèrent donc que les sous-unités sont reliées entre elles par des ponts disulfures.

3. VOLUME SPECIFIQUE PARTIEL .

3.1. Calcul théorique .

Les données de MUENSCH et al. (1976) (voir tableau suivant) nous ont autorisé le calcul théorique de la contribution des aminoacides au volume spécifique partiel de la forme C_4 .

Si cette forme n'était constituée que d'acides aminés, son volume partiel $\bar{v}$ serait théoriquement égal à :

$$\bar{v}_p = \frac{\sum \bar{v}_i n_i (M_i - 18)}{\sum n_i M_i} = \frac{190840,84}{261813,3} = 0,729 \text{ ml.g}^{-1}$$

En réalité, la BuChE est une glycoprotéine et HAUPT et al. (1966) ont calculé que la copule glucidique représente 23,9 % de la masse totale de l'enzyme. La partie protéique se réduit donc à 76,1 % et, de ce fait, sa contribution au volume spécifique partiel n'est que de $0,554 \text{ ml.g}^{-1}$.

Il est possible de chiffrer le volume spécifique partiel de la partie glucidique. Selon HAUPT et al., les 23,9 % de glucides se répartissent de la façon suivante : Hexoses : 9,3 %, N-acétylhexosamines : 8,4 %, NANA : 6,0 %, Fucose : 0,2 %. Les volumes spécifiques partiels de ces molécules étant connus (GOTTSCALK, 1966,

p. 61), on peut alors calculer leur contribution, mais ne connaissant pas leur nombre par molécule, on détermine le volume spécifique partiel de la partie glucidique à partir des pourcentages en poids (p_i) de chacune d'elles.

$$\frac{\sum v_i p_i}{100}$$

Amino acides	n_i résidus	M_i	$M_i - 18$	$n_i(M_i - 18)$	v_i	$v_i n_i(M_i - 18)$
Asp	222	133,1	115,1	25552,2	0,59	15075,79
Thr	119	119,1	101,1	12030,9	0,70	8421,63
Ser	153	105,1	87,1	13500,5	0,63	8505,31
Glu	223	147,1	129,1	28789,3	0,66	19000,94
Pro	104	115,1	97,1	10098,4	0,76	7674,78
Gly	233	75,1	57,1	13304,3	0,64	8514,75
Ala	177	89,1	71,1	12584,7	0,74	9312,68
Cys	32	121,2	103,2	3302,4	0,63	2080,51
Val	112	117,1	99,1	11099,2	0,86	9545,31
Met	25	149,2	131,2	3280	0,75	2460
Ile	91	131,2	113,2	10301,2	0,90	9271,08
Tyr	119	181,2	163,2	19420,8	0,71	13788,77
Leu	172	131,2	113,2	19470,4	0,90	17523,36
Phe	110	165,2	147,2	16192	0,77	12467,84
Lys	180	146,2	128,2	23076	0,82	18922,32
His	42	155,2	137,2	5762,4	0,67	3860,81
Arg	125	174,2	156,2	19525	0,70	13667,50
Trp	78	204,2	186,2	14523,6	0,74	10747,46
Σ	2319			261813,3		190840,84

Contribution des aminoacides au volume spécifique partiel de C_4 calculé d'après les données de MUENSCH et al. (1976) .

Résidus	p_i (%)	v_i	$v_i \cdot p_i$
Hexoses (D-Gal, D-Man, D-Glc) --	9,3	0,613	5,700
N-Acétylhexosamines -----	8,4	0,666	5,594
NANA -----	6,0	0,584	3,504
Fucose -----	0,2	0,678	0,135

Ainsi,

$$\bar{v}_g = 0,149 \text{ ml.g}^{-1}$$

Le volume spécifique partiel théorique de C_4 est donc :

$$\bar{v}_{\text{théor}} = \bar{v}_{AA} + \bar{v}_g = 0,703 \text{ ml.g}^{-1}$$

3.2. Volume spécifique partiel expérimental .

En raison des distances de migration x' plus courtes en milieu D_2O que dans l'eau, les formes C_2 et C_3 nous sont apparues le plus souvent confondues et la détermination de leur volume spécifique partiel n'a pu être effectué par ultracentrifugation.

Seuls ont été déterminés par cette technique, les volumes spécifiques partiels apparents des formes C_1 et C_4 par rapport à l'albumine humaine (SAH) ($\bar{v} = 0,733 \text{ ml.g}^{-1}$) et à la catalase bovine ($\bar{v} = 0,730 \text{ ml.g}^{-1}$).

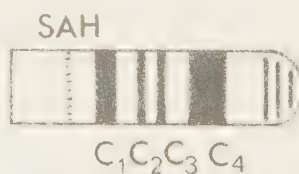
	par rapport à la SAH	par rapport à la catalase
C ₁	0,723	0,713
C ₄	0,727	0,727

En dépit de différences sensibles entre les volumes spécifiques partiels des deux formes déterminés par rapport à la catalase, imputables aux différences de forme et d'hydratation qui existent entre ces deux enzymes, les volumes spécifiques du monomère et du tétramère apparaissent identiques et de l'ordre de $0,721 \text{ ml.g}^{-1}$. Ce résultat, en accord avec les valeurs que l'on attribue aux glycoprotéines, est cependant plus élevé que la valeur théorique calculée à partir de la composition en sucres et en aminoacides de l'enzyme. La différence peut s'expliquer, en partie, par le fait que, dans le calcul théorique, nous n'avons pas tenu compte des phénomènes d'électrostriction, mais elle peut aussi résulter, si l'on néglige les erreurs expérimentales, d'interactions avec des petites molécules qui ont tendance à faire augmenter le volume spécifique partiel; de telles molécules peuvent être représentées par les phospholipides.

4. CONSTANTES DE SEDIMENTATION .

Par ultracentrifugation en gradient de saccharose, la relation de MARTIN à AMES (1961) nous a permis de déterminer les constantes de sédimentation apparentes et de donner une estimation des masses moléculaires qui leur correspondent.

En plus des 4 formes habituelles, trois autres formes de faible intensité, correspondant aux formes C post 4, ont été observées dans certaines expérimentations.



Le tableau suivant comporte les valeurs apparentes des constantes calculées par référence à la catalase ($S_{20,w} = 11,3$) et à l'albumine humaine ($S_{20,w} = 4,6$), ainsi que les constantes de sédimentation standardisées.

Connaissant le volume spécifique partiel, on peut standardiser les constantes de sédimentation apparentes en les ramenant à la valeur qu'elles prennent dans l'eau à 20°C [BON et al. (1973)], mais elles conservent leur caractère relatif, étant entendu que ces valeurs standards se réfèrent aux $S_{20,w}$ de la sérum albumine humaine et de la catalase de boeuf.

$$(S_{app})_i = \frac{x_i}{x_m} \cdot (S_{20,w})_m$$

et,

$$S_{20,w} = \frac{DM}{RT} (1 - \bar{v} \rho_w)$$

donc :

$$(S_{20,w})_i = (S_{app})_i \cdot \frac{(1 - \bar{v}_i \rho_w)}{(1 - \bar{v}_m \rho_w)} \cdot \frac{(1 - \bar{v}_m \rho)}{(1 - \bar{v}_i \rho)}$$

i = inconnu

m = marqueur

$\bar{v}_i = 0,721 \text{ ml.g}^{-1}$: valeur moyenne prise par hypothèse identique pour les 4 formes de la BuChE.

$\bar{v}_m = 0,730 \text{ ml.g}^{-1}$ pour la SAH, $0,733 \text{ ml.g}^{-1}$ pour la catalase.

$\rho = 1,0828$

$\rho_w = 1$

	S app	$S_{20,w}$ par rapport à la catalase	S app	$S_{20,w}$ par rapport à la SAH
C ₁	5,82	5,72	5,31	5,24
C ₂	7,92	7,78	7,90	7,79
C ₃	9,20	9,04	8,77	8,66
C ₄	12,39	12,17	12,16	12,00
Formes	16,82	16,53	15,48	15,28
post C ₄	16,68	18,36	16,57	16,35
	19,97	19,62	17,39	17,17

Les masses moléculaires calculées par la relation de MARTIN & AMES sont en bonne corrélation avec celles qui ont été obtenues par électrophorèse.

	Masses moléculaires apparentes	
	Détermination par rapport à la catalase	Détermination par rapport à l'albumine humaine
C ₁	92300	85600
C ₂	147000	155000
C ₃	184000	181500
C ₄	287000	297000
Formes	454000	426000
post C ₄	532000	471000
	588000	507000

Comme pour les résultats précédents, les valeurs de M doivent être interprétées comme apparentes et relatives de surcroît puisqu'elles ont été déterminées par rapport à la catalase et à l'albumine.

Si on compare les deux séries de mesures, on constate que les résultats diffèrent légèrement pour une forme donnée et que, lorsqu'on passe du monomère au tétramère, la masse moléculaire de ce dernier est inférieure à quatre fois celle du monomère. Il y a à cela deux explications possibles :

- Il n'est pas évident que les différentes formes de la BuChE présentent exactement les mêmes propriétés hydrodynamiques; or, la constante de sédimentation est reliée à la forme de la molécule, elle-même dépendante du rapport de friction f/f_0 .

- Si, au sein même d'une même série d'homopolymères, il peut y avoir des variations du rapport de friction, la probabilité que de telles variations existent est encore plus grande

entre les éléments de cette série et des protéines étrangères, en l'occurrence, les deux marqueurs.

Il vient alors que l'équation de MARTIN & AMES,

$$\frac{S_x}{S_y} = \left[\frac{M_x}{M_y} \right]^{2/3}$$

n'est rigoureusement exacte que pour les protéines dont le rapport de friction est le même.

$$(f/f_0)_x = (f/f_0)_y$$

Si cette condition est satisfaite, les deux protéines auront un comportement analogue dans le champ de gravitation et le rapport de leur constante de sédimentation sera directement reliable au rapport de leur masse moléculaire .

Dans tous les autres cas, il est nécessaire, si on veut les comparer, de tenir compte de leur différence d'asymétrie, d'hydratation et de volume spécifique partiel. La relation de MARTIN & AMES devient alors :

$$\frac{S_x}{S} = \frac{(f/f_0)_y}{(f/f_0)} \cdot \left[\frac{M_x}{M_y} \right]^{2/3}$$

Nous mettrons à profit cette propriété pour tirer des renseignements sur la géométrie relative des différentes formes.

5. POINTS ISOELECTRIQUES .

La détermination du point isoélectrique des différentes formes de la BuChE par électrofocalisation en gel de polyacrylamide, en présence d'un mélange d'ampholines, tel que l'on ait une variation continue et quasi-linéaire du pH (voir figure), quelles que soient les méthodes de détection de l'activité, nous a révélé

un grand nombre de formes, jusqu'à 8, d'intensités relatives variables mais, en majorité, localisées entre pH 2,9 et 4,35.

Il ne nous a pas été possible de mesurer avec précision le point isoélectrique de chaque forme prise individuellement car, isolées après tronçonnage du gel et soumises à une nouvelle électrophorèse ou à une électrofocalisation, on constate dans le premier cas qu'elles s'interconvertissent; dans le second, qu'elles engendrent de nouvelles espèces qui sont, vraisemblablement, des conformères.

Il semble cependant que les points isoélectriques des formes C_1 , C_3 et C_4 soient compris entre 2,90 et 4,35. Celui de C_2 , légèrement supérieur, se situe entre 4,10 et 4,50.

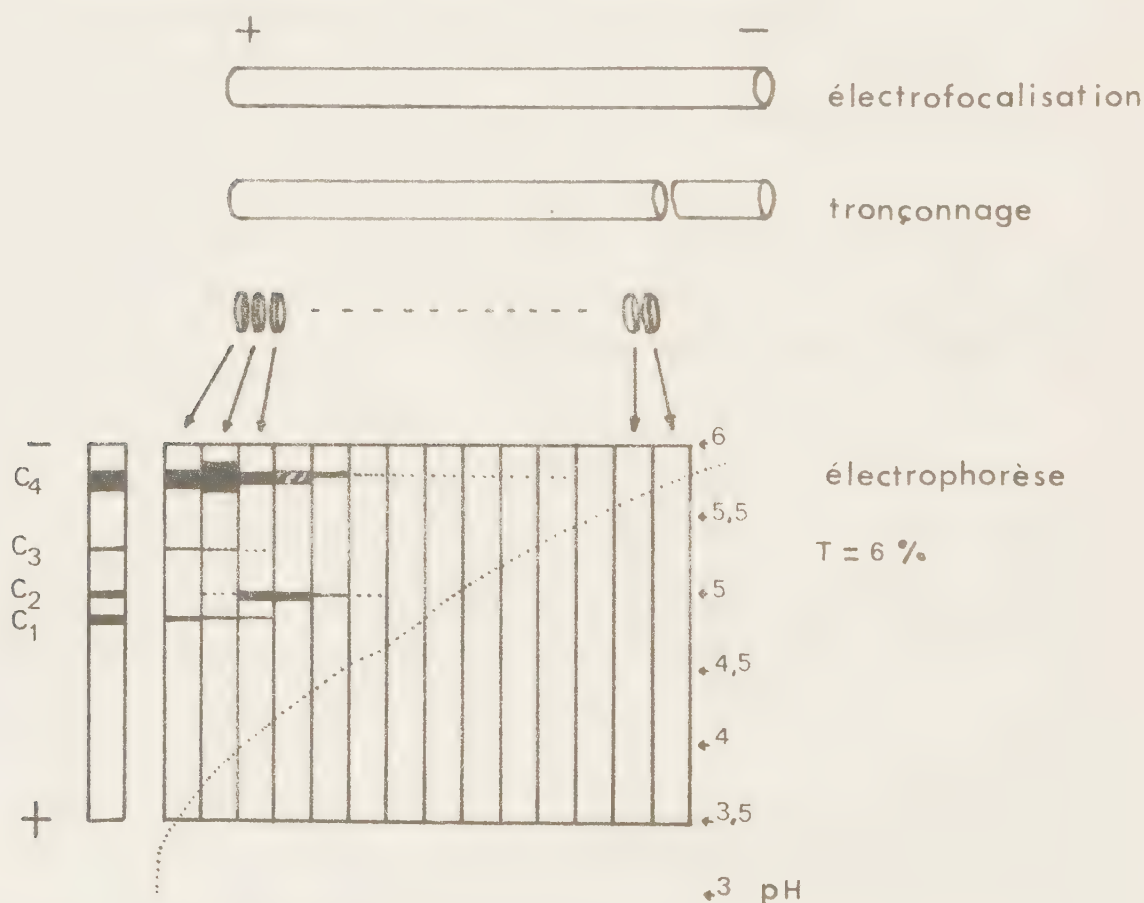


Fig. 11 : Electrofocalisation du sérum, suivie d'une électrophorèse classique sur gel de polyacrylamide à T= 6%.

Le gel d'électrofocalisation a été tronçonné sur une longueur de 56 mm et chaque rondelle de 4 mm déposée à la surface des gels d'électrophorèse.

La courbe en pointillé qui se superpose aux 14 gels représente la variation du pH enregistrée sur les 56 mm de gel sectionnés .

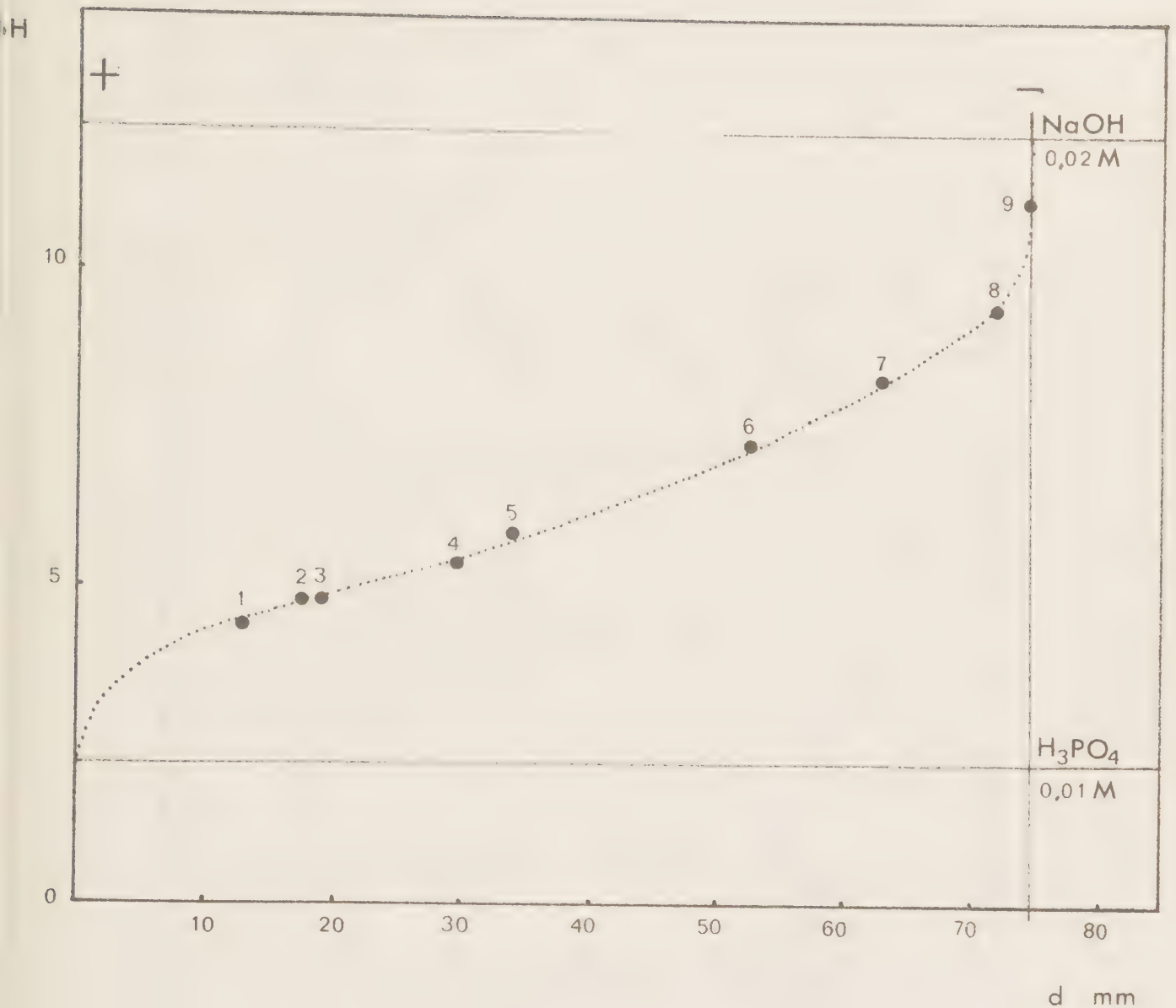


Fig. 12 : Variation du pH en fonction de la distance.

1. ferritine; 2,3. S.A.B.; 4. β -lactoglobuline;
5. ovalbumine; 6. myoglobine de cheval; 7. myoglobine de cachalot; 8. ribonucléase; 9. cytochrome C: il est confondu avec la cathode.

Points isoélectriques des formes différentes de la BuChE

Zones	ELLMAN				JUUL				GUILBAULT			
	(BuSch),		N = 6		(BuSch),		N = 10		(N - MIA),		N = 4	
	pI	s	± intervalle intensité ($\alpha = 0,05$) relative		pI	s	± intervalle intensité ($\alpha = 0,05$) relative		pI	s	± intervalle intensité ($\alpha = 0,05$) relative	
1	2,87	0,22	0,23	++++	3,08	0,08	0,05	++++	3,00	0,08	0,12	++++
2	3,88	0,22	0,23	++++	3,84	0,11	0,08	++++	3,70	0,14	0,22	++++
3	4,35	0,07	0,07	+++	4,38	0,12	0,08	++				
4	4,65	0,07	0,07	+++	4,65	0,04	0,03	++	4,70	0,10	0,16	++
5	4,86	0,05	0,05	+++	4,83	0,05	0,03	++				
6	5,15	0,20	0,21	+	5,33	0,16	0,11	+	5,20	0,21	0,33	+
7	6,22	0,35	0,36	++	6,18	0,22	0,15	+	6,18	0,25	0,39	+++ (*)
8	7,40	0,35	0,36	+	6,90	0,20	0,14	+	7,4	0,30	0,47	+

(*) Cette intensité relative plus élevée est probablement due à la participation d'arylestérases à l'hydrolyse du N.MIA dont la spécificité est plus large que la BuSch.

Après traitement prolongé à la neuraminidase de *Clostridium perfringens*, on constate un déplacement global des pI vers les pH alcalins, avec la majorité de l'activité située entre pH 7 et 8.

fluorescence
N-MIA

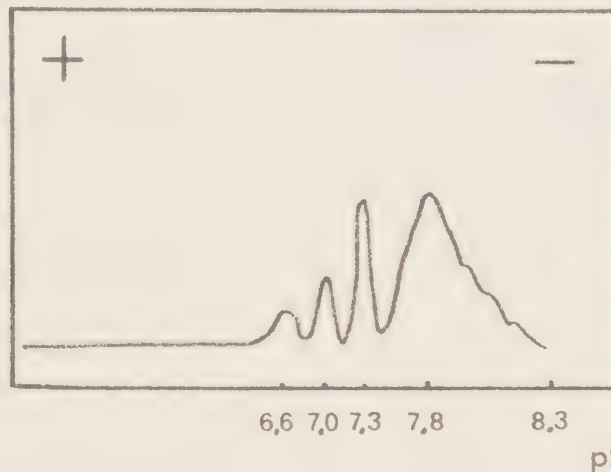


Fig. 12 : Points isoélectriques après traitement à la neuraminidase .

L'action prolongée de la neuraminidase sur la forme C_4 isolée engendre plusieurs espèces dont les points isoélectriques apparaissent de l'ordre de 6,6; 7,00 et 7,8. Ce dernier pic, le plus intense, présente une traînée jusqu'à pH 8,30 (Fig. 12).

Traitée dans les mêmes conditions, la forme C_2 ne voit son point isoélectrique que faiblement augmenté (4,75).

Nous avons déjà souligné le caractère marginal de C_2 ; ce résultat vient confirmer nos assertions et apporte un élément structural nouveau pouvant expliquer le comportement de cette forme.

A l'état natif, C_2 apparaît moins acide que les autres formes. Or, après traitement à la neuraminidase, la faible variation positive de pI que nous enregistrons (+ 0,45 en moyenne) signifie qu'une faible quantité d'acide N-acétylneuraminique a été libérée par rapport aux autres formes dont le pH augmente de plusieurs unités, mais le pI de C_2 demeure néanmoins acide.

Points isoélectriques après traitement par la neuraminidase

	ELLMAN N = 6			JUUL N = 10			GUILBAULT N = 4		
	(BuSch)		relative	(BuSch)		relative	(N-MIA)		relative
	pI	s		pI	s		pI	s	
A	4,55	0,07	+	4,50	0,05	0,03			
B	5	0,20	+	5,10	0,14	0,10			
C	5,95	0,13	+	5,97	0,04	0,03	+		
D	6,53	0,15	+	6,70	0,18	0,13	++	6,60	0,15
E	7,10	0,20	++	7,00	0,19	0,13	++	7,00	0,20
F	7,38	0,07	++++	7,23	0,05	0,03	++++	7,30	0,15
G	7,75	0,12	++++	7,63	0,15	0,10	++++	7,80	0,18
H	trainée jusqu'à 8,10	-	+++	8,15	-	-	++	trainée jusqu'à 8,30	-

Donc, si C_2 contient moins d'acide N-acétyl neuraminique que ses partenaires, elle doit essentiellement son caractère acide et sa grande mobilité électrophorétique ($R_{m_0}C_2 > R_{m_0}C_1$ et $R_{m_0}C_3$) à la présence de groupements carboxyliques périphériques constitutifs de la chaîne polypeptidique, par opposition aux autres formes dont l'acidité, à l'état natif, est surtout due à la présence de NANA. La perte de cet acide entraînant une augmentation du pI de 3 à 4 unités, on peut imaginer que la surface des formes désialylées doit être très différente de celle de C_2 traitée.

Plusieurs explications peuvent être proposées.

La perte de l'acide N-acétyl neuraminique entraîne un important remaniement structural de ces formes, alors qu'elle n'affecte pratiquement pas C_2 , ou bien déjà, à l'état natif, les surfaces des trois formes C_1 , C_3 , C_4 diffèrent de celle de C_2 et le départ du NANA ne fait que dévoiler une situation préexistante; enfin, on peut envisager une troisième hypothèse qui concilie les deux précédentes : non seulement les surfaces des trois isomères de taille différent de celle de C_2 , mais l'acide N-acétyl neuraminique qui est totalement ionisé au pH physiologique (son $pK_a = 2,6$) contribue à déterminer la géométrie, voire la cohésion des sous-unités, et son départ provoque une grave perturbation structurale bouleversant l'état d'agrégation et la conformation de la chaîne polypeptidique.

A partir des données de MUENSCH et al (1976) relatives à la composition en aminoacides de C_4 , nous avons pu déterminer le point isoélectrique théorique que cette forme aurait si elle était totalement désialylée, dépourvue d'une copule glucidique et si les quatre groupements ionisables que nous avons pris en considération (β -COOH de l'acide aspartique, γ -COOH de l'acide glutamique, ϵ -NH₂ de la lysine et le groupement guanidine de l'arginine) étaient tous exposés en surface et n'interagissaient pas entre eux.

La valeur que nous avons obtenue, pI = 5,47, malgré les approximations auxquelles nous avons dû nous soumettre, est

intéressante. Le point isoélectrique théorique de l'enzyme étant plus faible de 1,5 à 2,5 unités que les points isoélectriques de l'enzyme après départ de l'acide N-acétylneuraminique, la BuChE apparaît moins acide qu'elle ne devrait être en théorie. Dans la réalité, une partie des groupements carboxyliques latéraux doivent être masqués. Ce masquage peut s'opérer essentiellement de deux façons :

- Soit que les groupements β et γ carboxyliques hydrophiles restent présents à la surface mais sont neutralisés par un engagement covalent avec d'autres molécules; l'amidation conduisant à l'asparagine (Asn) et à la glutamine (Gln) constitue de processus le plus probable. Ces chaînes latérales amidées peuvent rester libres, mais l'asparagine peut, à son tour, s'associer à des sucres par glycosylation. La liaison glycosamine entre le carbone 1 de la N-acétyl glucosamine et l'azote amidé de l'asparagine étant fréquemment rencontrée dans les glycoprotéines sériques (KORNFELD & KORNFELD, 1976), on peut admettre qu'une grande partie des chaînes glucidiques est associée à la chaîne polypeptidique par des liaisons de ce type.



D'ailleurs, l'étude des courbes de mobilité électrophorétique en fonction du pH, réalisée par GAFFNEY (1970), montre que l'enzyme contient très peu de groupements α , β et γ carboxyliques exposés.

- Cependant, si une partie des groupements carboxyliques est effectivement neutralisée, le point isoélectrique élevé de l'enzyme désialylée implique également que des groupements aminés soient exposés. Cette exposition qui ne se manifeste que lorsque l'enzyme est native peut être due à l'effet d'écran créé par les résidus d'acide N-acétylneuraminique, l'action de la neuraminidase provoquant leur démasquage. On peut aussi envisager l'hypothèse d'un bouleversement complet de la structure, consécutif au départ de l'acide N-acétylneuraminique, entraînant l'émergence de ces groupements.

Enfin, d'un point de vue strictement mathématique, notre équation ne nous donne qu'une seule racine positive, donc un seul point isoélectrique, alors qu'après désialylation (comme avant, d'ailleurs), pour une forme donnée, on observe plusieurs points isoélectriques. Compte-tenu de l'interconvertibilité déjà évoquée, l'existence possible de conformères peut, dès lors, être avancée.

6. MOBILITE ELECTROPHORETIQUE .

6.1. Mobilité libre relative : Rm_0 .

L'extrapolation, à concentration de gel nulle (T_0), des droites de régression représentatives de la variation de la mobilité en fonction de la concentration du gel (Fig. 2), nous a fourni les valeurs des mobilités relatives des 4 formes, à pH 8,4, en tampon Tris/glycocolle, de force ionique 0,0225.

$$\log Rm = \log Rm_0 - K_R T$$

	C_1	C_2	C_3	C_4
Rm_0	$1,67 \pm 0,02$	$2,37 \pm 0,04$	$2,16 \pm 0,01$	$3,56 \pm 0,13$

6.2. Mobilité libre absolue : m_0 .

Connaissant K_R (Fig. 2), $T = f(x)$ (Fig. 6) et $t_{0,5} = k$ (Fig. 9), nous avons déterminé la mobilité libre absolue de chaque forme par intégration entre $x = 0$ et $x = x_L/2$ de l'expression:

$$m_0 = \frac{1}{t_{0,5}} \int_0^{x_L/2} e^y . dx$$

$$\text{avec } y = 2,3 K_R (0,4 x^2 + 1,2 x + 3,3)$$

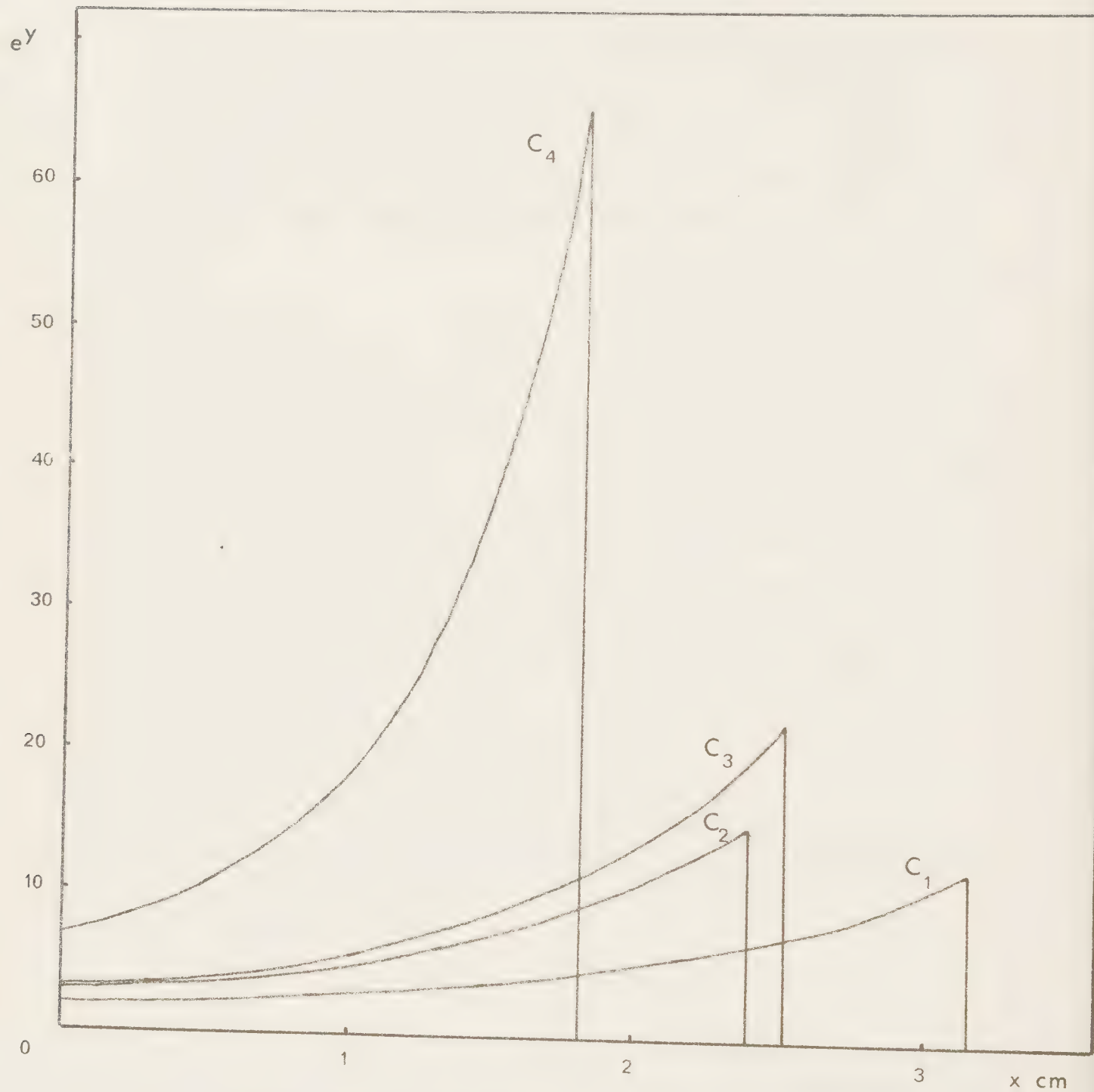


Fig. 13 : Graphes de $e^y = f(x)$ entre $x = 0$ et $x = x_L/2$ pour les quatre formes de Ta BuChE.

$$y = 2,3 K_R (0,4 x^2 + 1,2 x + 3,3)$$

	C_1	C_2	C_3	C_4
K_R	0,097	0,138	0,151	0,257
$x_L/2$ (cm)	3,162	2,399	2,534	1,910
t 0,5 (sec)	13579	10532	15067	18540
Aire sous la courbe (cm^2)	15,486	15,520	21,446	43,484

Les mobilités libres des quatre formes croissent du monomère au tétramère, mais la mobilité de C_2 est légèrement supérieure à celle de C_3 . Cet écart, associé à la faible différence de masse de ces deux enzymes, traduit la relation de proximité qui existe entre elles.

La forme C_2 ne faisant pas partie de la famille monomère-dimère-tétramère mais étant proche du dimère, on peut dès lors avancer l'hypothèse que C_2 est une forme dérivée de C_3 ; un dimère diminué, auquel il manque un fragment de masse de l'ordre de 20000 et contenant moins de NANA que les autres formes.

	C_1	C_2	C_3	C_4
$m_0 \cdot 10^5$	- 6,73	- 8,69	- 8,40	- 13,84
$(\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1})$	$\pm 0,53$	$\pm 0,64$	$\pm 0,69$	$\pm 1,35$

On peut enfin noter l'excellente corrélation ($r = 0,99$) des valeurs des mobilités relatives avec les mobilités absolues des quatre formes.

CHAPITRE III

APPROCHE DE LA GEOMETRIE MOLECULAIRE

1. RAYONS DES SPHERES EQUIVALENTES : $\bar{R}$

La détermination du rayon de la sphère équivalente à chaque forme de BuChE, effectuée à partir des valeurs des coefficients de retardement K_R , en nous reportant à l'étalonnage constitué par les polymères de la sérum albumine bovine, nous a donné les résultats de la troisième colonne $\bar{R}$ (S.A.B.). Connaissant M et en prenant $\bar{v} = 0,721 \text{ ml.g}^{-1}$, l'application de la formule $\bar{R} = \left(\frac{3\bar{v}M}{4\pi N} \right)^{2/3}$ nous a fourni des résultats sensiblement identiques (quatrième colonne du tableau ci-dessous).

	K_R	$K_R^{1/2}$	$\bar{R} (\text{\AA})$ (S.A.B.)	$\bar{R} (\text{\AA})$ (formule)
C_1	0,097	0,311	29	29
C_2	0,138	0,371	34,5	34,6
C_3	0,151	0,388	36	36
C_4	0,257	0,507	46	44,7

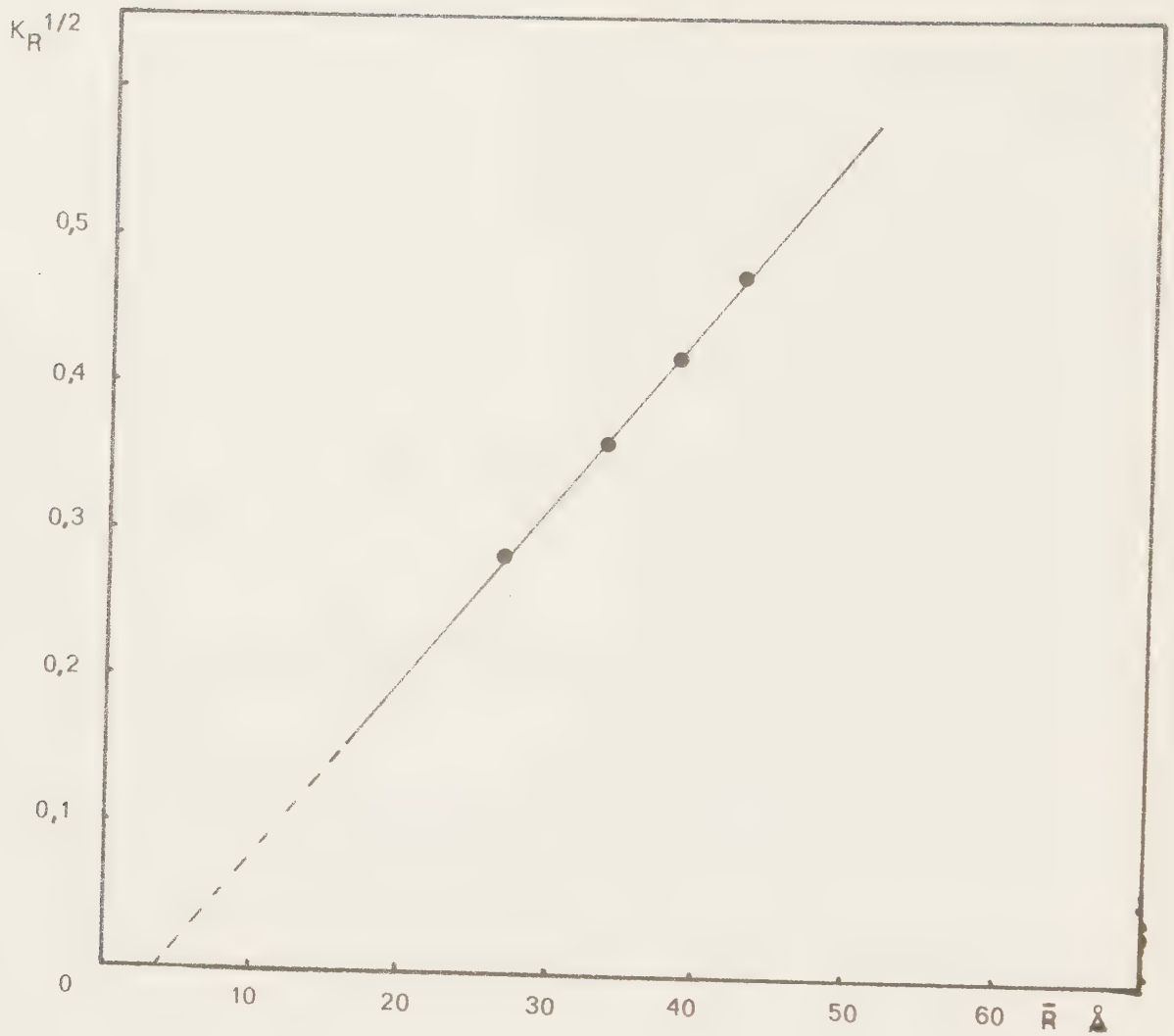


Fig. 1 : Droite d'étalonnage $K_R^{1/2} = f(\bar{R})$ polymères de la S.A.B.

	K_R	$K_R^{1/2}$	$\bar{R}(\text{\AA})$
S.A.B. ₁	0,082	0,286	26,9
S.A.B. ₂	0,132	0,363	33,8
S.A.B. ₃	0,175	0,418	38,7
S.A.B. ₄	0,225	0,474	42,6

2. RAYONS DE STOKES : R_S .

Nous avons calculé le rayon de STOKES selon la méthode d'ANDREWS (1970) en portant les $\log M$ de nos formes sur la droite de régression de $\log M = f(\log R_S)$ tracée pour les polymères de la sérum albumine bovine.

	Log M	Log R_S	$R_S(\text{\AA})$
C_1	4,934	1,5925	39,1
C_2	5,164	1,659	45,7
C_3	5,214	1,677	47,6
C_4	5,496	1,759	57,5

3. RAPPORTS DE FRICTION : f/f_0 .

Les rapports de friction ont été estimés à partir des rapports des deux rayons $R_S / \bar{R}$.

	f/f_0	$\bar{e}(\text{\AA})$
C_1	1,348	10,1
C_2	1,320	11,1
C_3	1,322	11,6
C_4	1,286	12,8

4. HYPOTHESES SUR LA FORME ET LE TAUX D'HYDRATATION .

Si l'on admet que le taux d'hydratation des quatre formes est le même et, bien que l'épaisseur théorique moyenne de la couche d'eau $[\bar{e}(\text{\AA})]$ soit en légère progression, l'évolution des rapports de friction traduit une légère tendance à la diminution de l'asymétrie moléculaire lors de l'agrégation.

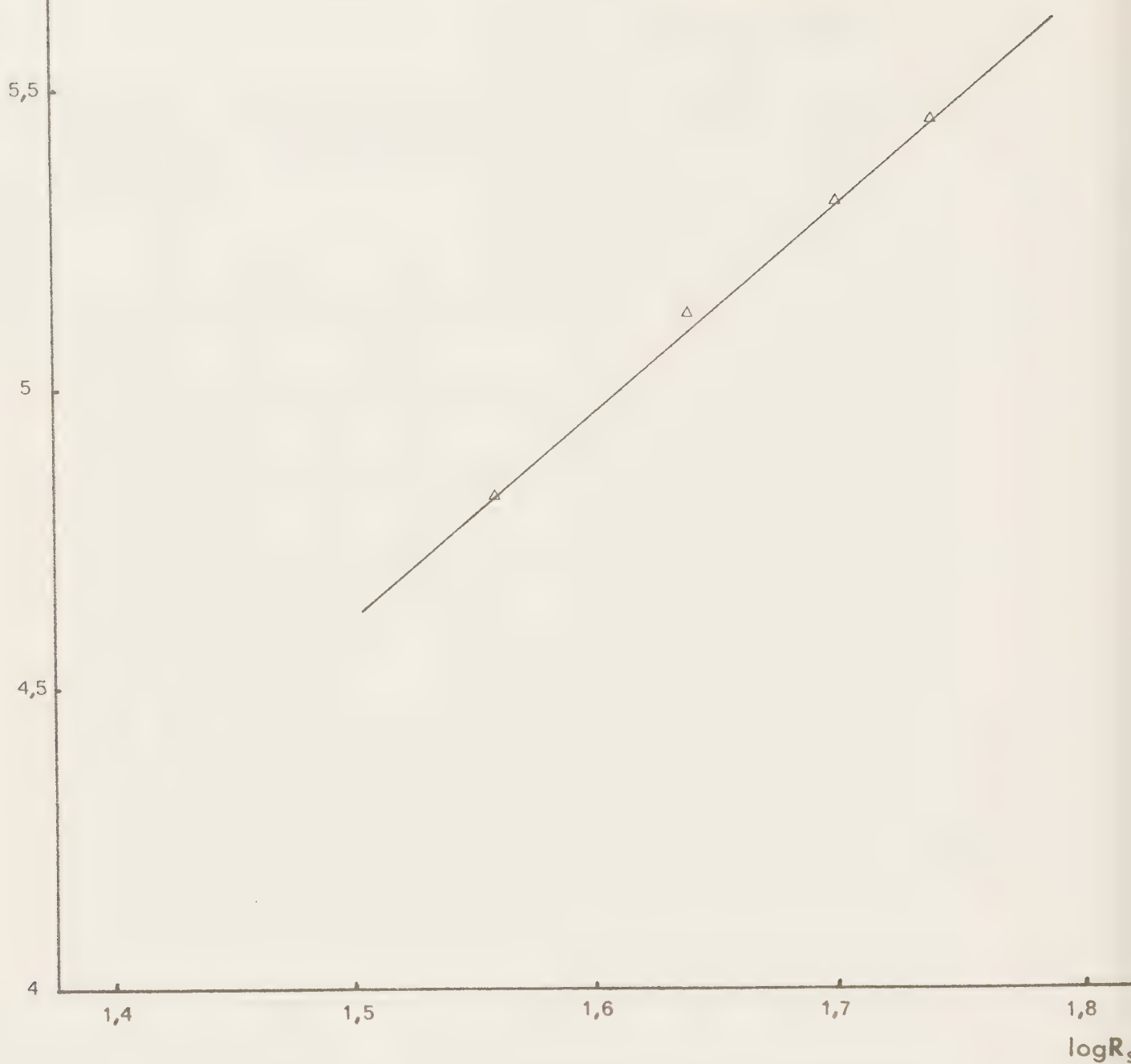


Fig. 2 : Droite d'étalonnage $\log M = f(\log R_S)$ polymères de 1a S.A.B.

	M	$\log M$	R_S	$\log R_S$
S.A.B. ₁	67000	4,826	36,3	1,569
S.A.B. ₂	134000	5,127	43,5	1,638
S.A.B. ₃	201000	5,303	50,4	1,702
S.A.B. ₄	268000	5,428	55,5	1,744

Cependant, le taux de solvation étant inconnu, il est impossible de se prononcer sur les rapports axiaux des quatre formes. L'examen des cas limites des couples asymétrie/solvatation a pu, cependant, nous apporter des indications sur les valeurs extrêmes de l'hydratation et de l'asymétrie que nos enzymes peuvent prendre.

	Solvatation maximale et asymétrie minimale	Solvatation minimale et asymétrie maximale	Etat intermédiaire
Taux de solvatation (ω) g/g	C_1 : 1,05 C_3 : 0,93 C_4 : 0,79	0	0,2
Rapport de friction (f/f_o) _S	(f/f_o) _S = 1 $f/f_{\min}$ { C_1 : 1,35 C_3 : 1,32 C_4 : 1,28	$f/f_{\min} = (f/f_o)_S$ C_1 : 1,35 C_3 : 1,32 C_4 : 1,28	(f/f_o) _S C_1 : 1,24 C_3 : 1,21 C_4 : 1,18
Magnitude de l'asymétrie a/b	1	PERRIN ONCLEY C_1 : 6,8 6,6 C_3 : 6,1 6,2 C_4 : 5,6 5,5	PERRIN ONCLEY C_1 : 4,8 4,8 C_3 : 4,4 4,6 C_4 : 4 4
Géométrie	Sphère de rayon R_S 	Ellipsoïde de révolution en forme de cigare	Ellipsoïde de révolution en forme de ballon de rugby

Si l'on pouvait considérer le cas intermédiaire pour lequel ω est constant et égal à 0,2 g/g, on confirmerait donc la tendance à la diminution de l'asymétrie pour le dimère et le tétramère.

Cependant, si le premier cas correspondant à la structure sphérique et présentant un maximum d'hydratation est peu probable, il indique que le taux d'hydratation n'est pas nécessairement constant pour les trois formes et qu'il a même tendance à diminuer lorsque le diamètre de la sphère augmente; d'ailleurs les différences observées entre R_S et $\bar{R}$ montrent que pour une symétrie sphérique le taux de solvation diminue alors que l'épaisseur moyenne de la couche d'eau de solvation est en légère augmentation.

Pour un ellipsoïde de révolution, le problème est identique; lorsque la masse moléculaire augmente, la quantité d'eau liée augmente également mais moins vite et il en résulte une diminution relative du taux de solvatation. L'affectation d'un taux d'hydratation de 0,2 g/g pour chaque forme n'est donc pas correcte et il est plus probable que ce taux va décroissant du monomère au tétramère. Pour rester dans le même ordre de grandeur, supposons qu'il soit respectivement de 0,30, 0,20 et 0,10, les résultats concernant l'évolution du rapport axial s'inversent !

	ω	$(f/f_0)_S$	a / b	
			PERRIN	ONCLEY
C_1	0,3	1,20	4,42	4,4
C_3	0,2	1,21	4,45	4,62
C_4	0,1	1,23	4,53	4,8

Donc, bien que les rapports de friction calculés à partir de R_S/R_0 aillent en décroissant, il n'est pas évident que la tendance soit à la diminution de l'asymétrie au cours de la polymérisation.

En dehors de toute considération géométrique, il est cependant possible d'obtenir une indication sur la valeur maximale que peut prendre le taux d'hydratation. Connaissant le taux d'hydratation de chaque aminoacide (exprimé en moles d'eau par mole d'acide) déterminé par KUNTZ à partir de l'étude des spectres de RMN de polypeptides (KUNTZ & KAUZMANN, 1974, pp. 325-327), et la composition en aminoacides de la forme C_4 (MUENSCH et al. 1976), on peut déterminer le taux d'hydratation maximum de cette forme. Le calcul postule que tous les ré-

sidus sont complètement hydratés, ce qui n'est exact que pour les protéines dénaturées, mais les exemples qu'apportent KUNTZ & KAUZMANN (pp. 327 et 333) montrent que les résultats qu'ils obtiennent sont comparables à ceux que fournissent les techniques classiques de détermination de l'hydratation. Il serait cependant abusif de vouloir généraliser; ainsi STAFFORD & SZENT-GYÖRGYI (1978) viennent de montrer récemment que le taux d'hydratation maximum des chaînes légères de myosine, estimé à 0,45 g/g par ce calcul, est fort éloigné du taux réel (0,19 g/g) obtenu par polarisation de fluorescence. Le calcul théorique, malgré le risque de fournir un résultat trop élevé, qu'il implique, permet d'accéder au taux maximum de solvation de l'enzyme. L'écart entre cette valeur et le taux de solvation maximum calculé à partir des données géométriques (sphère de STOKES) peut, théoriquement, apporter une indication sur la déviation de la forme sphérique (plus cet écart est important, plus grande est la probabilité que la protéine soit allongée) mais, étant donné les approximations auxquelles on est contraint de se livrer, cette estimation reste très aléatoire.

Ainsi, si un aminoacide i peut fixer n_i molécules d'eau, l'ensemble des n aminoacides de la forme C_4 (cf. p.236) de masse $M = \sum n_i (M_i - 18)$ fixera au maximum ω d'eau par gramme de protéine.

$$\omega = \frac{\left[\sum_{j=1}^n n_j n_i \right] \cdot 18}{\sum_{i=1}^n n_i (M_i - 18)}$$

En admettant qu'une moitié des résidus Asp, Glu, Tyr, Arg, His et Lys soit sous forme ionique Asp^- , Glu^- , Tyr^- , Arg^+ , His^+ , Lys^+ (solvation maximale) et que l'autre ne soit pas ionisée (solvation minimale), le taux d'hydratation maximum de la partie protéique de la forme C_4 est de l'ordre de 0,34 g/g. Il convient d'ajouter à cette valeur le taux d'hydratation maximum que peut prendre la copule glucidique en admettant également que tous les résidus sucrés soient solvatés. En se référant aux travaux de HAUPT et al. (1966) et de MUENSCH et al. (1976), on peut estimer à environ 400 le nombre de résidus glucidiques périphériques; le taux d'hydratation de chacun d'eux étant en moyenne de 3 moles d'eau par mole, la contribution des résidus glucidiques à l'hydra-

tation maximale de la forme C_4 , s'élève à 0,26 g/g. Le taux de solvation maximum de cette forme peut donc être estimé à 0,60 g/g. Cette valeur probablement très supérieure à la valeur réelle est néanmoins inférieure à celle que nous avons obtenue à partir du rapport de friction. S'il est difficile de prédire l'asymétrie à partir de ce résultat, on peut toutefois souligner l'impossibilité thermodynamique qui est faite à la protéine, d'exister sous forme sphérique.

5. CORRELATION DES DONNEES DE L'ELECTROPHORESE AVEC CELLES DE LA CENTRIFUGATION .

L'étude de la variation des rapports de friction lors du passage du monomère (m) au dimère (d) puis au tétramère (t) peut être corrélée avec les données de la centrifugation.

La masse moléculaire doublant à chaque étape, les variations des rapports de friction, lors des transitions $C_1 \rightarrow C_3$ et $C_3 \rightarrow C_4$ sont donc de la forme :

$$(f/f_o)_m / (f/f_o)_d = S_d / S_m \cdot (1/2)^{2/3} = S_d / S_m \cdot 0,629$$

$$(f/f_o)_d / (f/f_o)_t = S_t / S_d \cdot (1/2)^{2/3} = S_t / S_d \cdot 0,629$$

$$(f/f_o)_m / (f/f_o)_t = S_t / S_m \cdot (1/4)^{2/3} = S_t / S_m \cdot 0,397$$

Plutôt que d'écrire les rapports des constantes de sédimentation entachées du caractère relatif déjà souligné, nous avons préféré faire les quotients des distances de migration, théoriquement équivalents, selon la relation de MARTIN & AMES .

$$\frac{d_x}{d_{ref}} = \frac{S_x}{S_{ref}} \Rightarrow \frac{d_i}{d_j} = \frac{S_i}{S_j}$$

	$(f/f_0)_i / (f/f_0)_{i'}$	
	P.A.G.E.	Centrifugation $\frac{d_i}{d_{i'}} \left[\frac{M_i}{M_{i'}} \right]^{2/3}$
$C_1 \rightarrow C_3$	1,019	1,016
$C_3 \rightarrow C_4$	1,028	0,785
$C_1 \rightarrow C_4$	1,048	0,874

La corrélation est parfaite pour le passage du monomère au dimère mais, pour l'étape suivante, la dimérisation de C_3 , l'ultracentrifugation fait ressortir une brusque augmentation du rapport de friction, alors que les données de l'électrophorèse font apparaître une relative stabilité. Le tétramère semble posséder un f/f_0 1,27 fois plus grand que celui du dimère et, globalement, 1,14 fois plus élevé que celui du monomère.

Cette évolution peut être consécutive à une augmentation du taux d'hydratation ou du rapport axial du tétramère.

Cependant, nous avons fait remarquer que si le taux d'hydratation varie, la tendance est plutôt à sa diminution au cours du processus d'association des sous-unités. L'augmentation du rapport de friction du tétramère est donc vraisemblablement provoquée par une augmentation du rapport axial de cette forme.

Si $\omega_m > \omega_d > \omega_t$, les rapports de friction liés à la solvatation sont toujours légèrement supérieurs à 1.

$$\frac{(f/f_0)_{i,h}}{(f/f_0)_{i',h}} = \frac{\left[1 + \frac{\omega_m}{\bar{v}\rho} \right]^{1/3}}{\left[1 + \frac{\omega_d}{\bar{v}\rho} \right]^{1/3}} = \left[\frac{\bar{v}\rho + \omega_m}{\bar{v}\rho + \omega_d} \right]^{1/3} > 1$$

Si nous conservons les valeurs de $\omega_m = 0,3$, $\omega_d = 0,2$, $\omega_t = 0,1$, prises par hypothèse, en formant les rapports :

$$\frac{(f/f_0)_i}{(f/f_0)_{i'}} = \frac{(f/f_0)_{i,s}}{(f/f_0)_{i',s}} \cdot \frac{(f/f_0)_{i,h}}{(f/f_0)_{i',h}}$$

On peut calculer la variation relative de la géométrie lors des transitions $m \rightarrow d \rightarrow t$.

	$(f/f_0)_{i,h} / (f/f_0)_{i',h}$	$(f/f_0)_{i,s} / (f/f_0)_{i',s}$	
		P.A.G.E.	Centrifugation
$C_1 \rightarrow C_3$	1,034	0,984	0,982
$C_3 \rightarrow C_4$	1,039	0,989	0,755
$C_1 \rightarrow C_4$	1,075	0,974	0,813

Cette correction apportée, les contributions de la géométrie aux rapports de friction traduisent toutes une augmentation du rapport axial, donc de l'asymétrie, au cours du processus d'agrégation, surtout lors du passage du dimère au tétramère.

En réalité, notre enzyme est une glycoprotéine, avec une partie glucidique relativement importante, et les taux d'hydratation réels sont probablement plus élevés que les valeurs moyennes que nous avons prises par hypothèse. Quels que soient ces taux, le problème n'est pas modifié et, dans tous les cas, les rapports de friction reflètent l'augmentation de l'asymétrie moléculaire du tétramère.

- Le passage du monomère au dimère ne semble pas modifier le rapport axial de façon sensible et cette transition évoque la formation d'un nouvel ellipsoïde de type expansé.

- Par contre, le passage du dimère au tétramère s'ac-

compagne d'une importante variation du rapport axial dans le sens de la formation d'un ellipsoïde plus allongé.

Une étude plus précise de la géométrie des trois formes a été rendue possible en faisant appel à des modèles imaginés par le traitement des fonctions de PERRIN et des équations de KIRKWOOD.

6. MODELES DE PERRIN

Les fonctions de PERRIN nous permettent de construire des modèles moléculaires rigides correspondant à l'association de sous-unités sphériques ($a/b = 1$) , ellipsoïdales aplaties ($a/b = 0,5$) ou allongées ($a/b = 2$) ne pouvant que s'associer linéairement.

$$\frac{S_i}{S_{i'}} = \frac{(f/f_0)_{i's}}{(f/f_0)_{i.s}} \cdot \left[\frac{M_i}{M_{i'}} \right]^{2/3}$$

Dans notre cas, il s'agit d'une famille de polymères dans laquelle M_i double à chaque stade de l'agrégation.

	Nombre de sous- unités	a/b	f/f ₀	Modèle	Observations
Sphères expansées I	1	1	1	o	
	2	1	1	o	
	4	1	1	○	
Ellipsoïdes expansés II	1	2	1,044	o	
	2	2	1,044	○	
	4	2	1,044	○	
Ellipsoïdes allongés (association de sphères) III	1	1	1	o	
	2	2	1,044	∞	
	4	4	1,182	○○○○	
Ellipsoïdes allongés (association d'ellip- soïdes allongés) IV	1	2	1,044	o	
	2	A 1	1	8	
		B 4	1,182	∞	
	4	A 0,5	1,042	○○○○ *	* équivalent à un ellipsoïde aplatis.
		B 8	1,433	○○○○	
		C 2	1,044	∞	
Ellipsoïdes aplatis (association d'ellipsoïdes aplatis) V	1	0,5	1,042	0	
	2	A 1	1	○*	* pseudosphère cf. I-2
		B 0,25	1,165	∞	
	4	A 2	1,044	○○○*	* équivalent à un ellipsoïde allongé.
		B 0,125	1,374	○○○○	
		C 2	1,044	○*	* équivalent à un ellipsoïde allongé

MODELES	RAPPORTS THEORIQUES		
	S_m / S_d	S_d / S_t	S_m/S_t
I	0,629	0,629	0,397
II	0,629	0,629	0,397
III	0,658	0,713	0,469
IV	A 0,602	A→A 0,655	A 0,396
	B 0,712	A→C 0,656	B 0,545
		B→B 0,762	C 0,397
		B→C 0,555	
V	A 0,603	A→A 0,656	A 0,398
	B 0,703	B→B 0,741	B 0,523
		A→C 0,656	
		B→C 0,563	

	Rapports expérimentaux moyens
S_{C_1} / S_{C_3}	0,618
S_{C_3} / S_{C_4}	0,731
S_{C_1} / S_{C_4}	0,452

Les rapports expérimentaux des constantes de sédimentation confrontés aux rapports théoriques correspondant aux différents modèles nous montrent que la formation de C_3 doit obéir à un processus de type expansif modifiant très peu la géométrie du dimère par rapport à celle du monomère. Par contre, l'étape suivante entraîne une modification importante de la géométrie et correspond apparemment à l'association linéaire de deux dimères.

Ce modèle reste cependant très rigide; il n'admet pas

de déformation et interdit aussi que les sous-unités fassent, entre elles, des angles autres que 90 et 180°.

7. MODELES DE KIRKWOOD .

Les équations de KIRKWOOD permettent d'établir des modèles dans lesquels toutes les déformations sont permises. Nous nous sommes limité, pour le tétramère, à 5 modèles dans lesquels les sous-unités peuvent faire entre elles des angles de 60, 90, 120 et 180°.

Modèles				Rapports théoriques		
				$\frac{r_{\text{mod}}}{r_{\text{théor}}}$	$\frac{r_{\text{mod}}}{r_{\text{théor}}}$	$\frac{r_{\text{mod}}}{r_{\text{théor}}}$
I	Modèle linéaire $\theta = 180^\circ$			0,667	0,667	0,444
II	Modèle allongé en zig-zag (dimères accolés)		$\theta = 90^\circ$	0,666	0,633	0,425
			$\theta = 120^\circ$	0,666	0,693	0,462
III	Modèle carré ou en bateau (dimères accolés)		$\theta = 90^\circ$	0,666	0,633	0,425
			$\theta = 120^\circ$	0,666	0,693	0,462
IV	Modèle en ligne (dimères décalés)		$\theta = 60^\circ$	0,666	0,626	0,417
V	Modèle compact tétraédrique			0,666	0,600	0,400

La comparaison de nos résultats expérimentaux avec les rapports théoriques fait ressortir le caractère allongé de la forme C_4 , qui apparaît comme un dimère de dimères, les deux doublets occupant dans l'espace des positions relativement excentrées, en zig-zag, avec $\theta \in 90-120^\circ$.



En conclusion, il apparaît que, quelle que soit la valeur du rapport axial de C_1 , le rapport axial de C_3 reste sensiblement le même alors que celui de C_4 double pratiquement. Cette tendance à l'extension du C_4 est peut-être liée à une répartition non uniforme des charges électriques, en particulier, des charges négatives portées par les groupements carboxyliques du NANA qui, par répulsion électrostatique, confèrent à l'enzyme tétramérique une forme allongée avec ses deux dimères en position légèrement excentrée.

CHAPITRE IV

DETERMINATION DES CONSTANTES DE MICHAELIS ET DES VITESSES MAXIMA APPARENTES

1. RESULTATS .

Les courbes $v = f(t)$ ont été tracées pour chaque concentration et chacune des quatre formes. Les valeurs des vitesses initiales déterminées graphiquement à partir des tracés précédents, nous ont ensuite servi à construire les diagrammes de LINEWEAVER-BURK d'où nous avons tiré, pour chaque forme, $V'_{\max}$ app et K'_m app.

Sept séries de mesures ont ainsi été pratiquées.

Les valeurs moyennes des paramètres catalytiques sont assignées d'un intervalle de confiance à 95 %.

	C_1	C_2	C_3	C_4
$K'_m \text{ app.} \cdot 10^3$	$20,92 \pm 7,17$	$49,35 \pm 15,29$	$47,57 \pm 11,37$	$4,40 \pm 0,45$
$V'_{\max} \text{ app.}$ (unités arbitraires)	$3,22 \pm 1,26$	$2,70 \pm 1,07$	$2,85 \pm 0,49$	$5,55 \pm 1,34$

Ces résultats confirment donc qu'à l'hétérogénéité moléculaire se surajoute une hétérogénéité catalytique assez fortement marquée.

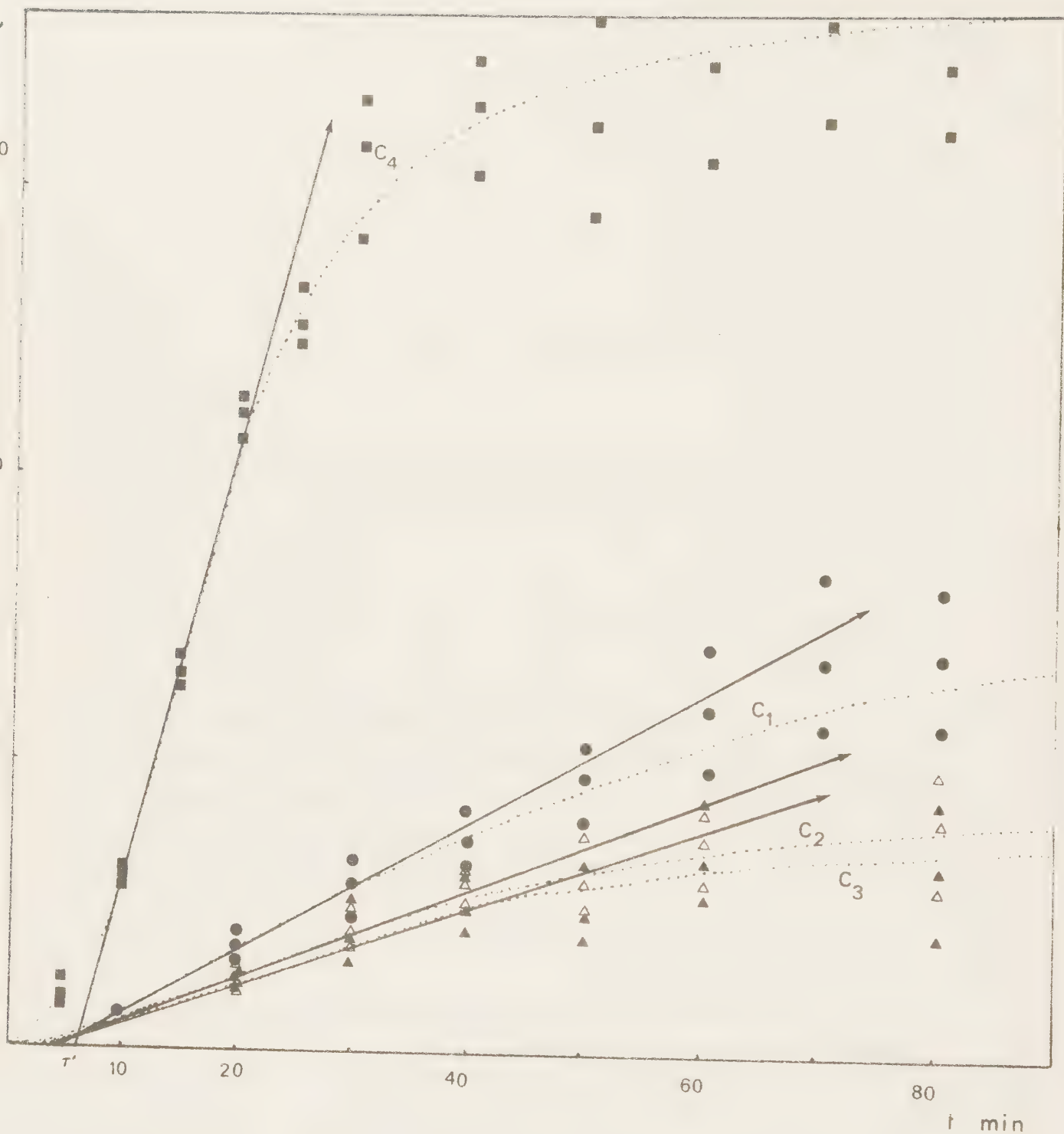


Fig. 1 : Exemple de courbes d'hydrolyse $v' = f(t)$ pour $S = 4.10^{-3}M$.

- Les vitesses sont exprimées en unités arbitraires.
- En pointillé, les courbes de vitesse d'apparition des produits de la réaction.
- Les flèches en trait plein représentent les vitesses initiales tracées à partir de $t' = 5$ min.

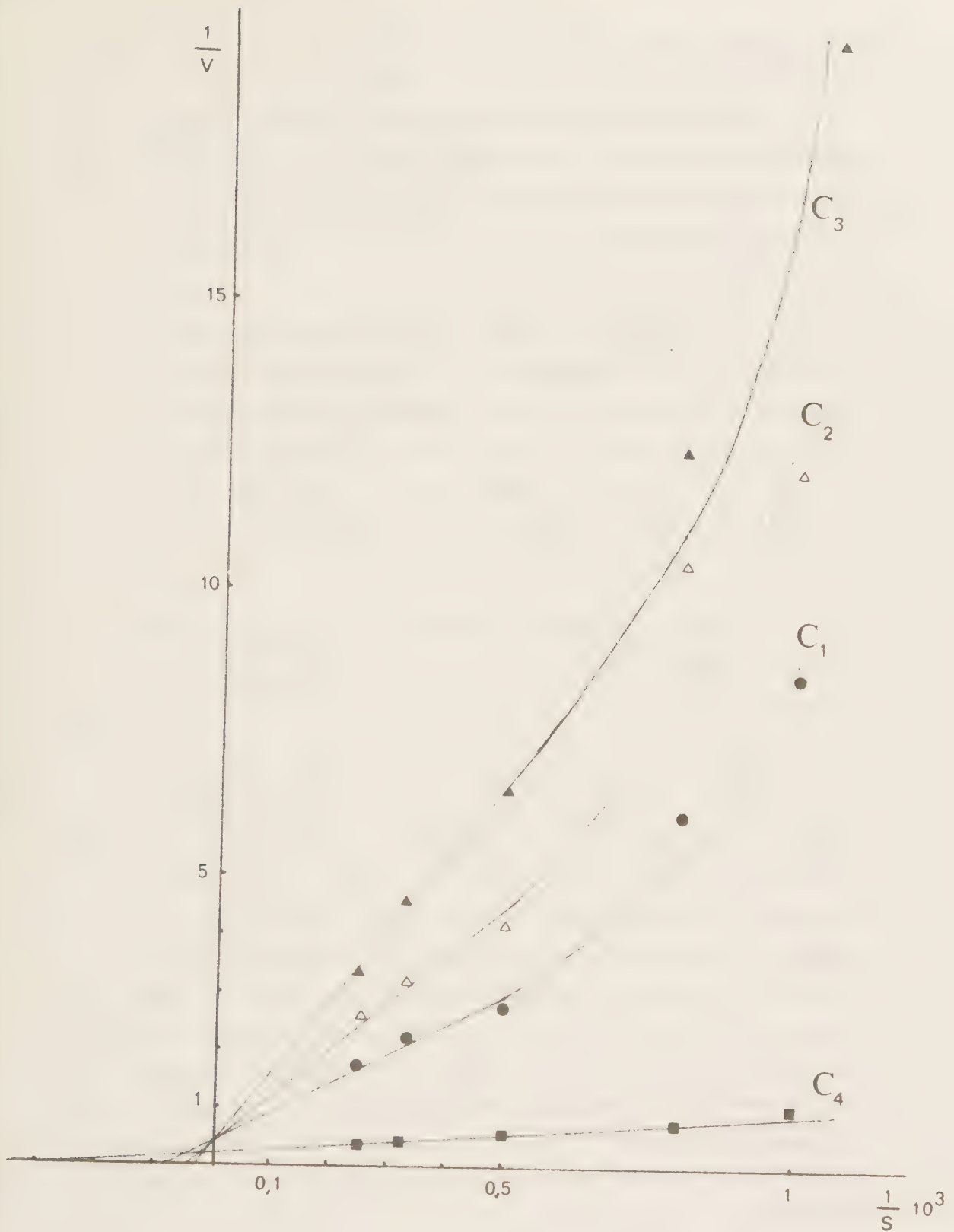


Fig. 2 : Diagramme de LINEWEAVER-BURK

$$\frac{1}{V'_i} = \frac{1}{V'_{\max \text{ app}}} + \frac{K'_{m \text{ app}}}{V'_{\max \text{ app}}} \cdot \frac{1}{S}$$

2. INTERPRETATION .

Bien que ces paramètres ne soient que des grandeurs phénoménologiques dont il est difficile de tirer des renseignements sur les propriétés catalytiques réelles des quatre formes, ils peuvent toutefois nous permettre de les comparer entre elles.

Tout d'abord, les écarts observés entre C_2 et C_3 au risque $\alpha = 0,05$, ne permettent pas de déceler entre ces deux formes de différences dans leurs propriétés catalytiques . Leur $K'_m \text{ app}$ est environ 10 fois plus fort que celui du C_4 et avec une $V'_{\text{max app}}$ environ deux fois plus faible que celle de C_4 , elles apparaissent toutes deux particulièrement défavorisées sur le plan catalytique.

La forme C_1 présente également un $K'_m \text{ app}$ plus élevé que C_4 , environ 5 fois plus fort, et sa $V'_{\text{max app}}$ est plus faible.

C'est donc le tétramère C_4 qui a, pour la butyrylthiocholine, la plus grande affinité. Bien que l'on doive rester dans le domaine de l'hypothèse, on peut spéculer d'un point de vue finaliste et, en nous référant à l'acétylcholinestérase, que le tétramère, forme achevée de l'enzyme, présente la configuration la mieux adaptée à l'approche du substrat et à la réaction enzymatique alors que, dans les formes légères, les sites actifs ont une configuration défavorisante. Il est possible aussi que les contraintes stériques imposées par la structure du gel aient entraîné des modifications de conformation, en particulier du site actif, dont l'intensité et les effets varient selon la forme sur laquelle elles sont appliquées.

D'autre part, aux faibles concentrations, on observe que les diagrammes de LINEWEAVER-BURK présentent une convexité très nette pour les formes C_1 , C_2 et C_3 . L'explication qui vient naturellement est celle d'un fonctionnement de type allostérique.

On voit mal cependant pourquoi le tétramère qui, au demeurant semble qualitativement et quantitativement l'espèce dominante, ne présenterait pas cette propriété. En fait, la théorie de KOBAYASHI & LAIDLER (citée par NGO & LAIDLER, 1975 a et b) prévoit que les diagrammes de LINEWEAVER-BURK ne sont pas linéaires mais tordent vers le haut lorsque la cinétique est contrôlée par la diffusion du substrat dans la matrice. Les auteurs attribuent cette déviation de la cinétique classique au fait que l'état stationnaire n'est probablement pas atteint aux faibles concentrations. Cette hypothèse nous semble d'autant plus acceptable que pour $(S) = 1,25$ et $1.10^{-3}M$ le temps de latence τ' sont plus que doublés.

CHAPITRE V

LA QUESTION DU NOMBRE DE SITES ACTIFS ET DE LA CONCENTRATION DE CHAQUE ESPECE ENZYMATIQUE

Au vu des premiers résultats concernant l'activité des différentes formes séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (c.f. chapitre "MISE EN EVIDENCE DE L'HETEROGENEITE MOLECULAIRE") et l'étude de leurs propriétés catalytiques, il apparaît que les trois espèces moléculaires parentes, le monomère, le dimère, le tétramère, coexistent toutes en concentration notable. Cette simple constatation exclut un processus d'association des sous-unités de type coopératif et, a fortiori, un processus obstructif. La troisième voie qui semble la seule possible est celle de l'association acoopérative. Dans cette hypothèse, les concentrations C_1 , C_3 et C_4 doivent être progressivement croissantes et sensibles à la dilution.

1. DETERMINATION DU NOMBRE DE SITES A PARTIR DE LA CONCENTRATION EN ENZYME .

Théoriquement, lorsque la vitesse maxima est atteinte, la réaction étant d'ordre zéro, la vitesse ne doit dépendre que de la concentration en enzyme.

$$V'_{\max} = k'_c [E]$$

et,

$$[E] = \frac{V'_{\max}}{k'_c}$$

La mesure de $V'_{\max}$ ou de l'activité lorsque le plateau est atteint devrait donc, en théorie, nous permettre de déterminer la concentration de chaque espèce enzymatique.

En réalité, le problème est plus complexe et l'accès à ce paramètre pourtant essentiel est illusoire par cette voie.

Il y a à cela deux explications :

a) - En raison du temps très long ($\tau = 67$ minutes) pour atteindre l'état stationnaire non réactionnel, l'état stationnaire réactionnel n'est jamais atteint au centre du gel et la cinétique globale que l'on suit, n'est pas d'ordre nul. La $V'_{\max}$ que l'on détermine, inférieure à la $V_{\max}$ réelle est encore sous la dépendance de la concentration en substrat. Cette dépendance, fonction de l'affinité de l'enzyme pour la butyrylcholine, conduit à l'impossibilité de déterminer les concentrations, mêmes relatives, des quatre formes à partir des mesures de $V'_{\max}$.

Une possibilité de déterminer $[E]$ aurait pu être envisagée à partir de la mesure des vitesses initiales. En effet, pour chaque concentration de substrat, la vitesse initiale est donnée par la relation :

$$v_i = \frac{V_{\max} \cdot (S)}{K_m + (S)} = \frac{k_c}{\left[1 + \frac{K_m}{(S)}\right]} \cdot [E]$$

La vitesse initiale apparaît donc proportionnelle à la quantité d'enzyme présente.

Donc, pour une concentration (S) donnée :

$$[E] = \frac{v}{k_c} \cdot \left[1 + \frac{K_m}{(S)}\right]$$

En admettant k_c constant pour les quatre formes, connaissant v et K_m , il serait alors possible de calculer $[E]$ relative.

En fait, la constante de Michaelis que l'on a mesurée est $K'_{m \text{ app}} > K_m$ et l'on ne sait pas si le rapport $K'_{m \text{ app}}/K_m$ est constant pour les quatre formes. En remplaçant K_m par $K'_{m \text{ app}}$, on introduit donc une erreur d'autant plus importante que le rapport $K'_{m \text{ app}}/(S)$ est, dans tous les cas, supérieur à un: l'erreur aurait été très importante pour les formes C_1 , C_2 et C_3 dont les concentrations relatives auraient été déterminées par excès alors que la concentration de C_4 l'aurait été par défaut.

b) - De plus, l'équation à vitesse maximale que nous formulons n'est valable que pour les enzymes ne possédant qu'un seul site; or, nous sommes en présence d'un monomère, d'un dimère et d'un tétramère dont le nombre de sites actifs fonctionnels pourra être compris entre 1 et n , le nombre de sous-unités.

Si, par hypothèse, nous admettons que chaque forme possède un nombre $m \leq n$ de sites identiques et complètement indépendants les uns des autres (la fixation du substrat sur l'un d'eux n'affecte pas les propriétés des sites vacants ou déjà occupés), la cinétique de fixation du substrat sur ces sites ou la vitesse d'hydrolyse de ce dernier doit être michaelienne. En d'autres termes, m molécules d'une enzyme à 1 site se comportent de la même manière que 1 molécule d'une enzyme possédant m sites (SEGEL, 1975, pp. 346-353).

La relation entre $V_{\max}$ et la concentration d'enzyme s'écrit donc,

$$V_{\max} = n k_c [E]$$

Il apparaît donc que la détermination de $[E]$ à partir de $V_{\max}$ n'est possible que si l'on connaît n et réciproquement.

2. APPROCHE DU PROBLEME .

Le comptage du nombre de coups par minute provenant du $[^3\text{H}]$ DFP fixé sur les centres actifs des quatre formes a pu cependant nous apporter des renseignements sur le nombre de sites par molécule et leurs concentrations relatives.

Le nombre de coups par minutes (cpm) est proportionnel au produit de la concentration molaire de chaque enzyme par le nombre de sites d'une molécule.

$$\text{cpm}_i = k n_i [E]_i$$

Or, nous ne connaissons ni n_i , ni $[E]_i$.

On peut cependant tester différentes hypothèses. En effet, si l'on postule que C_1 le monomère ne possède qu'un seul site, C_2 un ou deux, C_3 le dimère un ou deux, et C_4 le tétramère un, deux ou quatre sites, on peut établir 7 modèles.

Modèles	nombre de sites actifs par molécule			
	C_1	C_2	C_3	C_4
I	1	1	1	1
II	1	1	1	2
III	1	1	2	2
IV	1	2	2	2
V	1	1	1	4
VI	1	1	2	4
VII	1	2	2	4

Les probabilités d'existence de ces 7 modèles ne sont pas toutes égales. En particulier, le modèle I, dans lequel les

quatre formes ne possèdent chacune qu'un seul site, semble très peu probable. On imagine difficilement comment un tétramère engendré par un dimère à 1 site pourrait fonctionner plus efficacement que celui-ci avec pourtant trois sous-unités non fonctionnelles. Le modèle V semble tout aussi peu probable car, à moins d'un démasquage de 2 sites lors de la tétramérisation, on ne conçoit pas le passage d'un dimère à 1 site au tétramère à 4 sites.

Le choix doit donc s'opérer entre deux types de modèles:

- ceux chez lesquels le nombre de sites est égal au nombre de sous-unités : modèles VI et VII. Le modèle VI implique cependant que C_2 soit un dimère diminué ne possédant plus qu'un seul site fonctionnel;
- ceux chez lesquels l'association entraîne le masquage d'un site sur deux, ou ceux dont une sous-unité sur deux n'est pas fonctionnelle : modèles II, III, IV, avec, pour le modèle III, la même implication que pour le VI.

Ainsi, pour chacun des 7 modèles, on peut calculer les concentrations relatives des quatre formes :

$$k[E]_i = \frac{cpm_i}{n_i}$$

$$[E]_i \% = k[E]_i / \sum_1^4 cpm_i$$

Le tableau suivant donne le nombre moyen de cpm obtenu par le marquage des sites actifs des 4 formes

	C_1	C_2	C_3	C_4
$\overline{cpm}$	1288	706	1493	3528

On en tire les concentrations relatives $[E]_i$ % qui satisfont aux 7 modèles.

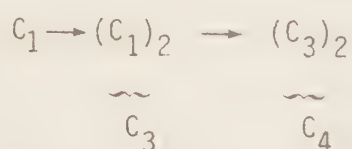
		C_1	C_2	C_3	C_4	$\sum_{i=1}^4 cpm_i$
I	$k \cdot E_i$	1288	706	1493	3528	7015
	E_i %	18,36	10,06	21,28	50,29	100
II	$k \cdot E_i$	1288	706	1493	1764	5251
	E_i %	24,52	13,44	28,43	33,59	100
III	$k \cdot E_i$	1288	706	746,5	1764	4504,5
	E_i %	28,59	15,67	16,57	39,16	100
IV	$k \cdot E_i$	1288	353	746,5	1764	4151,5
	E_i %	31,02	8,50	17,98	42,49	100
V	$k \cdot E_i$	1288	706	1493	882	4369
	E_i %	29,48	16,16	34,17	20,18	100
VI	$k \cdot E_i$	1288	706	746,5	882	3622,5
	E_i %	35,55	19,48	20,60	24,34	
VII	$k \cdot E_i$	1288	353	746,5	882	3269,5
	E_i %	39,39	10,79	22,83	26,97	100

Si l'association des sous-unités de la BuChE obéit réellement à un processus de type acoopératif, au cours duquel les concentrations croissent progressivement du monomère au tétramère, il est évident que seul le modèle II coïncide avec un tel processus. Si ce modèle est exact, il implique qu'une des deux sous-unités de C_3 ne fonctionne pas et que le tétramère ne résulte pas de la simple juxtaposition de 4 monomères, mais de l'association de 2 dimères.

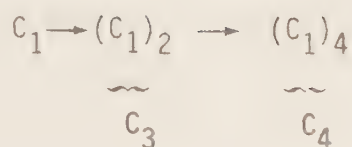
Hormis le cas des modèles I et V, les concentrations des quatre autres modèles n'évoluent pas de façon monotone mais passent par un maximum en C_3 . Or, aucun mécanisme conduisant à des structures quaternaires, au sens strict de BERNAL (c.f. KLOTZ et al., 1975)

ne peut donner lieu à de telles variations, sauf si le processus de formation du tétramère à partir de deux dimères est différent du processus d'association de deux monomères pour donner le dimère. En d'autres termes, la nature et l'étendue des zones d'interactions diffèrent pour les deux étapes. Sur ce dernier point, nous rejoignons le modèle II pour lequel il apparaissait que le C_4 est un dimère de dimères $(C_3)_2$.

Ainsi, quel que soit le nombre de sites par molécule, il semble que nous ayons la séquence :



plutôt que :



D'autre part, lorsqu'on dilue le sérum dans du chlorure de sodium à 9 %, on constate jusqu'au 1/200 que la diminution de l'activité des formes se fait dans le même rapport. Au delà de cette dilution, les activités trop faibles ne permettent plus les mesures densitométriques sur le gel. La dilution ne favorisant pas la désagrégation, la série de formes multiples de la série BuChE n'obéit pas au principe de LE CHATELIER, au contraire, le système apparaît très stable. Cette stabilité ne peut être due qu'à des liaisons de forte énergie entre les sous-unités.

CHAPITRE VI

NATURE DES INTERACTIONS ENTRE LES SOUS-UNITES

1. INTERCONVERTIBILITE DES FORMES .

L'électrophorèse des formes isolées, pratiquée à faible force ionique ($\mu = 0,0225$), c'est-à-dire dans notre tampon circulant usuel (TRIS/Glycocolle pH 8,4), nous a permis de mettre en évidence le phénomène d'interconvertibilité que nous suspicions (c.f. MISE EN EVIDENCE DE L'HETEROGENEITE MOLECULAIRE).

Les quatre formes isolées par électrophorèse et tronçonnage, soumises à une nouvelle électrophorèse, dans les mêmes conditions opératoires, s'interconvertissent partiellement.

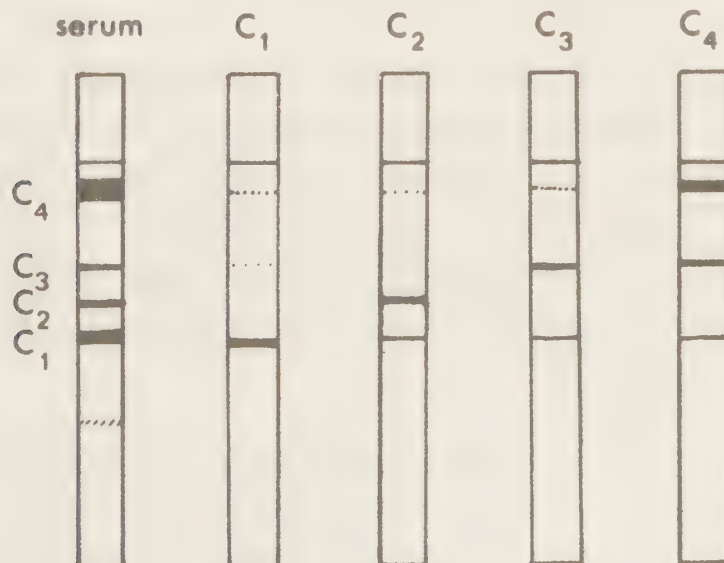


Fig. 1 : Interconversion des formes isolées

		Electrophorèse des formes isolées			
		C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
Pourcentages d'activité enregistrée après électrophorèse	C ₁	87,7	19,8	16,8	11,8
	C ₂	0	77,8	0	0
	C ₃	3,8	0	76,7	24,9
	C ₄	8,3	2,4	6,4	63,2

- La forme C₁ apparaît très stable et donne naissance à très peu de C₃ et de C₄.

- La forme C₂ en se dissociant donne C₁ et l'on observe une très faible quantité de C₄. Cette dernière provient très certainement de la réagrégation de C₁. L'intermédiaire C₃ dont l'activité est faible n'est pas détecté.

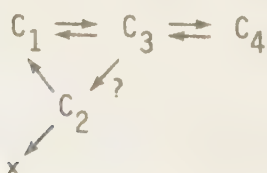
- La forme C₃, en se dissociant, engendre C₁.

- Enfin, C₄ libre, en proportions décroissantes, C₃ et C₁.

D'une façon générale, la tendance est à la dissociation : le monomère C₁ montre une faible tendance à l'association et les trois formes supérieures se dissocient toutes en proportions notables.

Le fait que ni C₁, ni C₃ et C₄ n'engendrent C₂ confirme le caractère marginal de celle-ci. Mais la production de C₁ par dissociation de C₂ montre l'existence d'un lien de parenté étroit entre cette forme et la famille d'isomères de taille. C₂ apparaît donc bien comme un dimère diminué dont une des sous-unités au moins reste fonctionnelle et s'identifie à C₁.

On peut donc établir le schéma relationnel



2. VARIATION DE LA FORCE IONIQUE DU TAMPON CIRCULANT .

Selon la théorie de DEBYE-HÜCKEL, lorsque la force ionique augmente, l'épaisseur de la couche ($1/K$) des contre-ions diminue ; il en résulte que les répulsions électrostatiques se font sentir à courte distance, d'où la possibilité aux monomères d'entrer en contact et de s'associer, alors qu'aux forces ioniques faibles, les répulsions se font à longues distances, provoquant la dissociation des oligomères ou interdisant leur association.

μ	0,001125	0,00225	0,00450	0,01125	0,0225	0,05	0,1225	0,3225	1,0225
$\log(\mu \cdot 10^3)$	0,051	0,352	0,653	1,051	1,352	1,698	2,088	2,508	3,009
10^{-8}	0,0108	0,0153	0,0217	0,0344	0,0486	0,0725	0,1136	0,1843	0,3282
$1/K (\text{\AA})$	92,6	63,3	46,1	29,0	20,5	13,8	8,8	5,4	3,0

Le comportement des quatre formes de la BuChE vérifie la théorie de DEBYE-HÜCKEL, mais l'influence de la force ionique sur l'état d'agrégation est relativement faible (figures 2, 3, 4, 5) . Lorsque la force ionique s'élève, la tendance à la formation des oligomères (C_3 et C_4) est peu accentuée. Aux faibles forces ioniques, les formes C_2 , C_3 et C_4 montrent également une faible propension à la dissociation. Quant au monomère, il reste d'une grande stabilité et, même aux forces ioniques les plus élevées, n'engendre aucune forme supérieure. La formation du dimère et du tétramère n'est donc pas un processus spontané répondant aux critères thermodynamiques de l'association quaternaire. Nous avons montré, par ailleurs, que l'équilibre du système n'est pas modifié par la dilution de l'enzyme. Il apparaît donc que les liaisons électrostatiques n'interviennent pas de façon déterminante dans le processus d'oligomérisation.

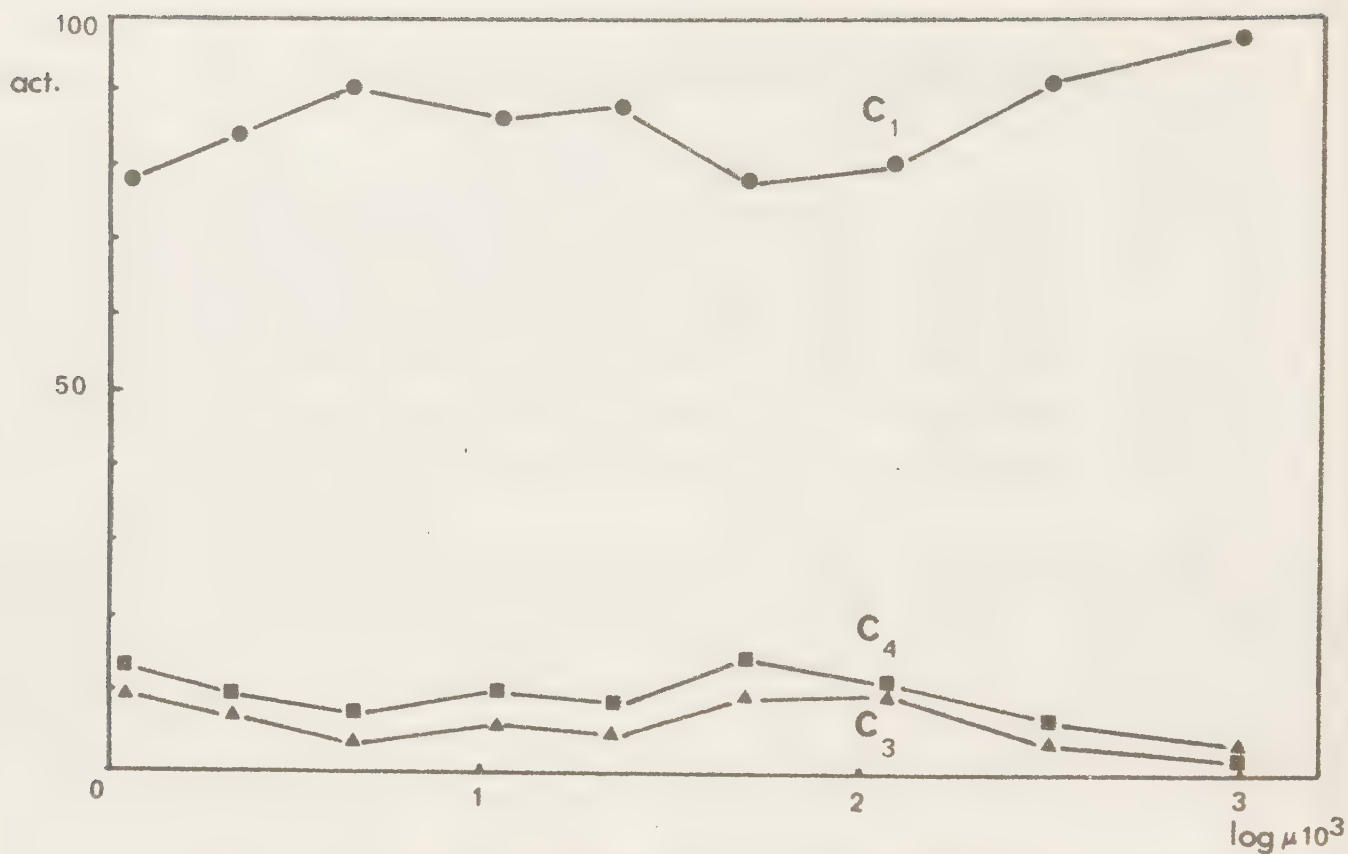


Fig. 2 : Formes engendrées par C_1 en fonction de la force ionique.

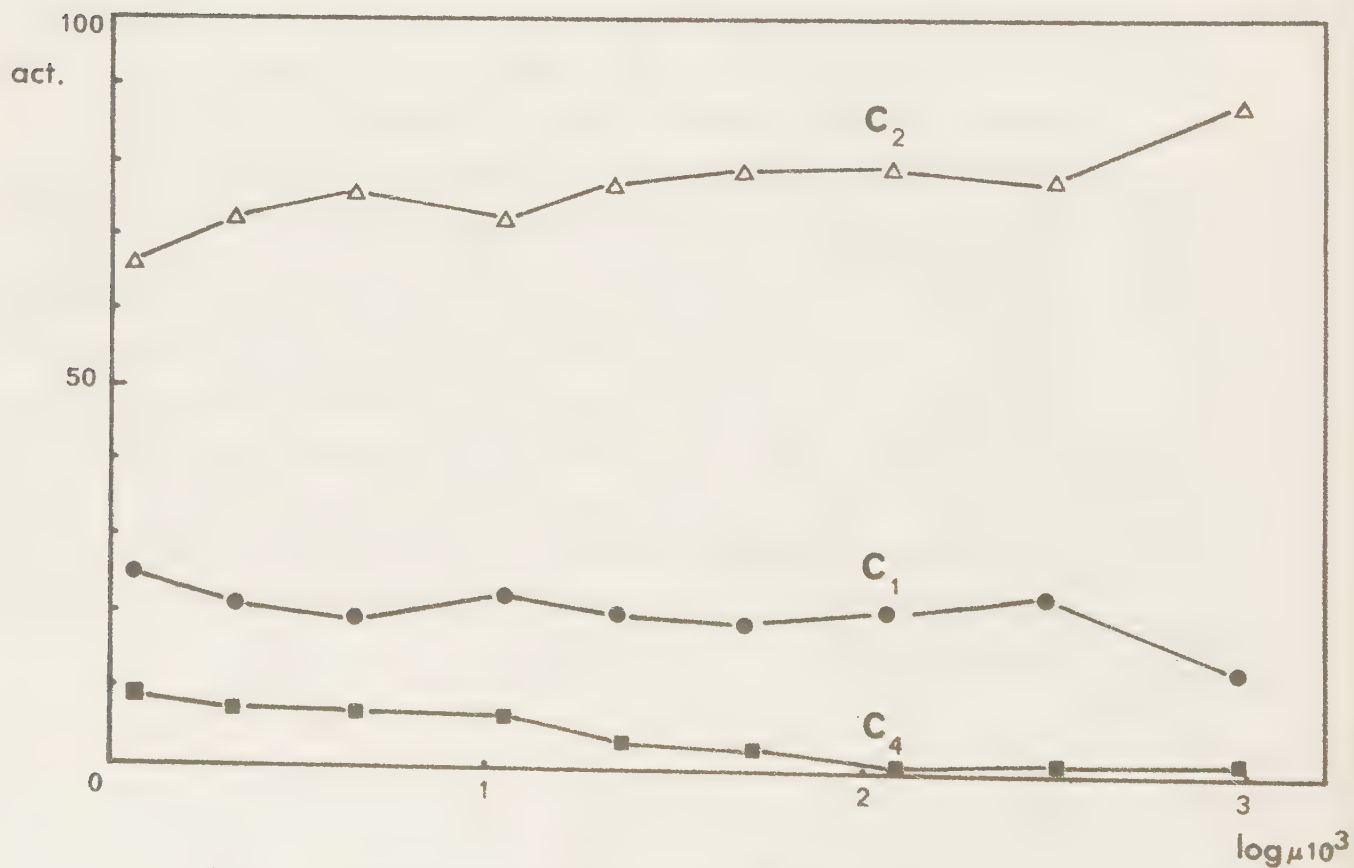


Fig. 3 : Formes engendrées par C_2 en fonction de la force ionique.

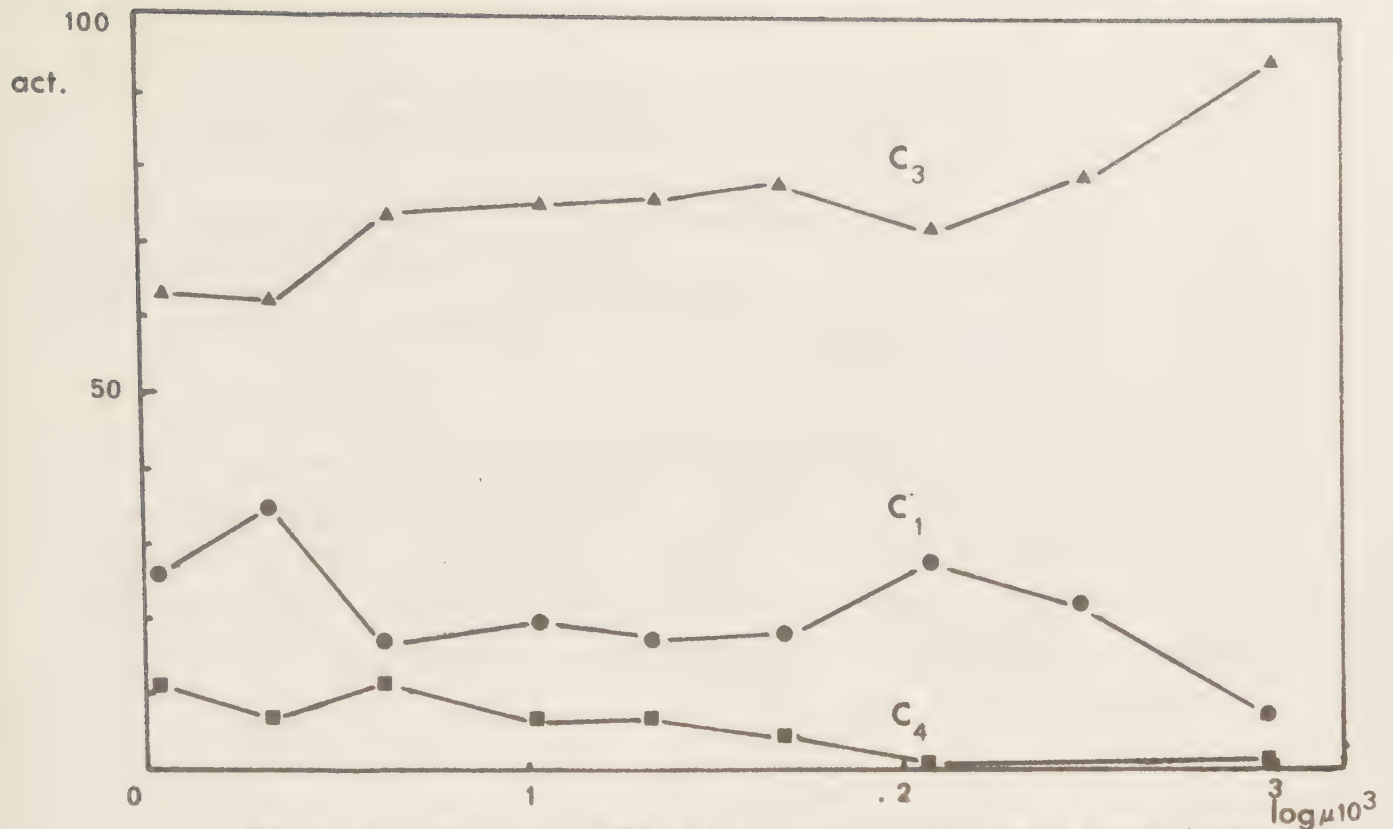


Fig. 4 : Formes engendrées par C_3 en fonction de la force ionique.

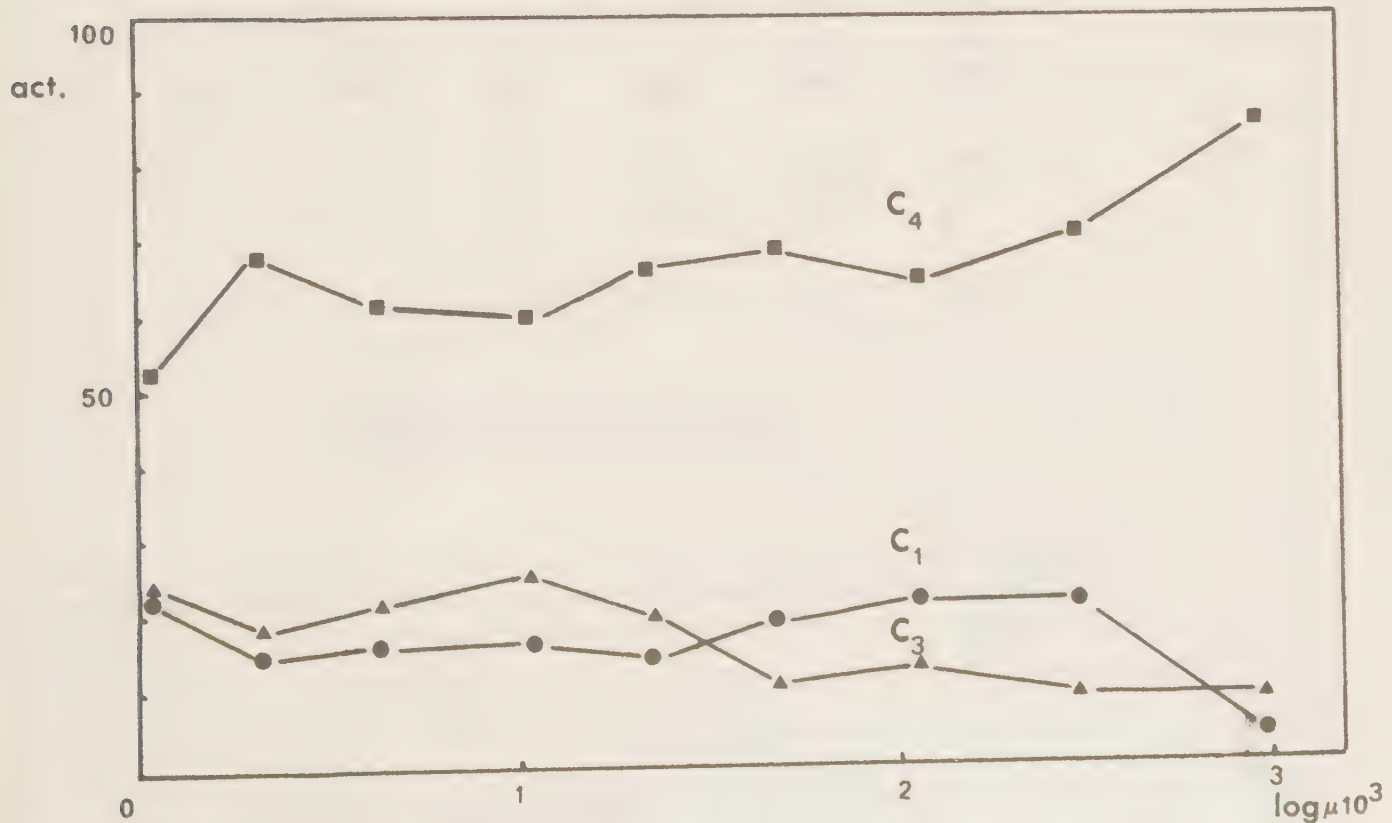


Fig. 5 : Formes engendrées par C_4 en fonction de la force ionique.

3. EXISTENCE DE PONTS DISULFURES INTERMONOMERIQUES .

Le traitement du sérum par le β -mercaptoéthanol provoque la disparition totale de C_2 et quasi totale de C_3 ; la forme C_4 ne semble pas (ou peu) affectée par le réducteur; par contre, l'intensité de C_1 augmente.

Le même traitement pratiqué sur les formes isolées entraîne la dissociation générale des oligomères avec génération de la forme C_1 . Cependant, dans nos conditions opératoires, la forme C_4 résiste à l'agent réducteur et ne se dissocie pas de façon significativement plus importante que spontanément.

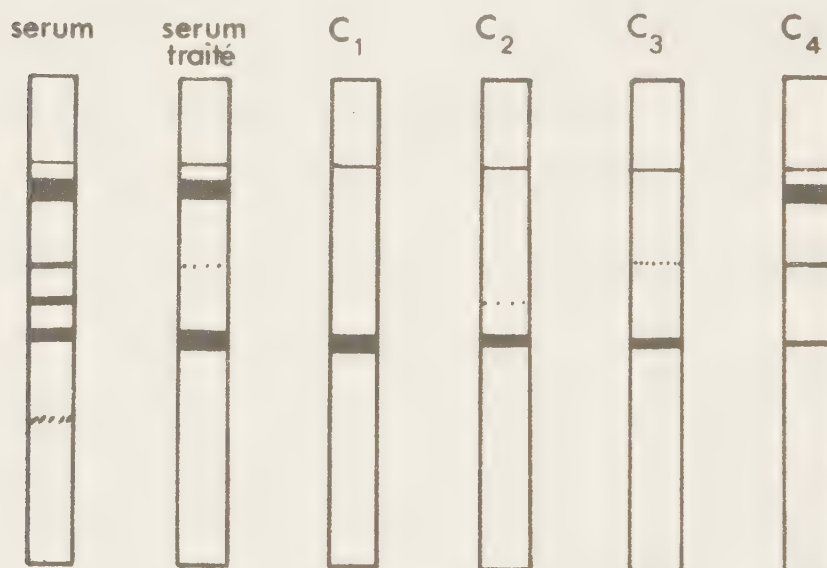


Fig. 6 : Traitement au β -mercaptoéthanol .

		Electrophorèse des formes isolées et traitées au β -mercaptoéthanol			
		C_1	C_2	C_3	C_4
Formes obtenues après électrophorèse	C_1	100 %	95 %	80 %	20 %
	C_2	0	5 %	0	0
	C_3	0	0	20 %	20 %
	C_4	0	0	0	60 %

Ces expériences permettent de tirer plusieurs conclusions:

Les formes C_2 et C_3 possèdent des ponts disulfures qui assurent la liaison des sous-unités entre elles. Leur réduction engendre C_1 . Le monomère possède donc un ou plusieurs groupes thiols. Ces ponts disulfures sont réductibles spontanément comme en témoignent la coexistence et l'interconvertibilité des quatre espèces enzymatiques à l'état natif. Cependant, les ponts disulfures de C_2 doivent être plus exposés que ceux de C_3 qui résistent mieux à l'agent réducteur et ne sont rompus que par des concentrations élevées de β -MCE. Cette différence apporte un argument supplémentaire en faveur de notre hypothèse sur la filiation $C_3 \rightarrow C_2$. Le défaut d'un fragment glucido-peptidique d'une masse moléculaire de l'ordre de 20000, laissant démasqués les ponts disulfures, permet leur réduction totale par le β -mercaptoéthanol.

La résistance du tétramère à l'action de l'agent réducteur peut être interprétée comme la conséquence d'un masquage plus efficace des ponts disulfures de chaque dimère par suite de leur association, mais peut résulter aussi de l'existence d'interactions de nature différente entre les deux dimères.

4. VARIATION DU pH ET DE LA FORCE IONIQUE .

Par ultracentrifugation en gradient de saccharose, en l'absence de chlorure de sodium, on n'observe aucune modification de l'état oligomérique entre pH 5,4 et 9,4. Les quatre formes coexistent en proportions invariables.

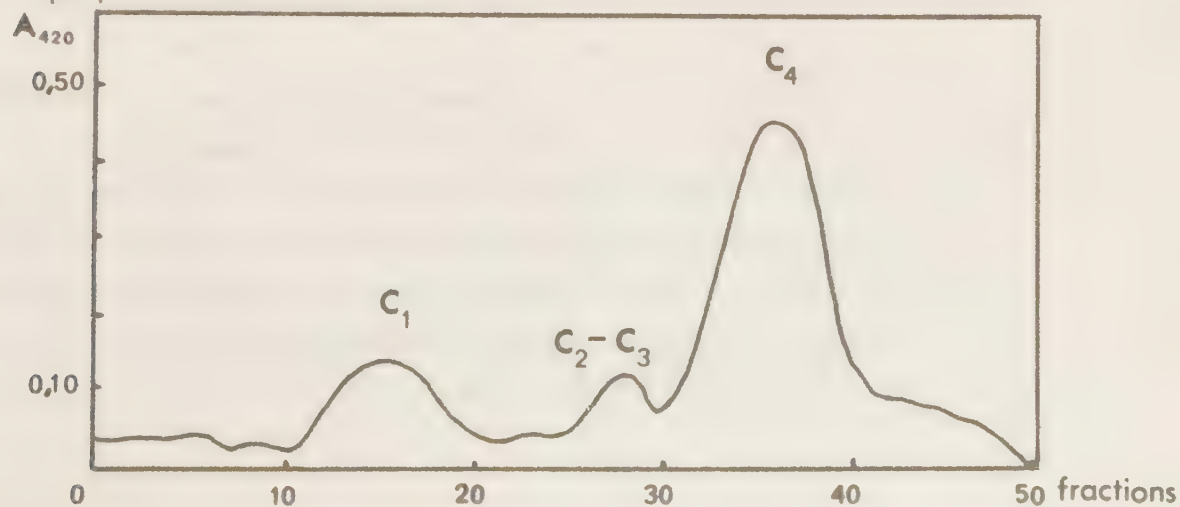


Fig. 7 : Fractionnement des formes multiples de la BuChE (gradient de saccharose 5-20 %).

Par contre, à pH 10,4, C_1 , C_2 - C_3 ont disparu et, seule, persiste la forme C_4 . A pH 11,4, l'activité enzymatique a totalement disparu.

Ces résultats, sauf le dernier, sont confirmés par l'électrophorèse. On observe à pH 10,4, une diminution de l'activité des trois formes légères. A pH 11,4, leur activité est devenue pratiquement nulle, tandis que celle de C_4 s'est accrue.

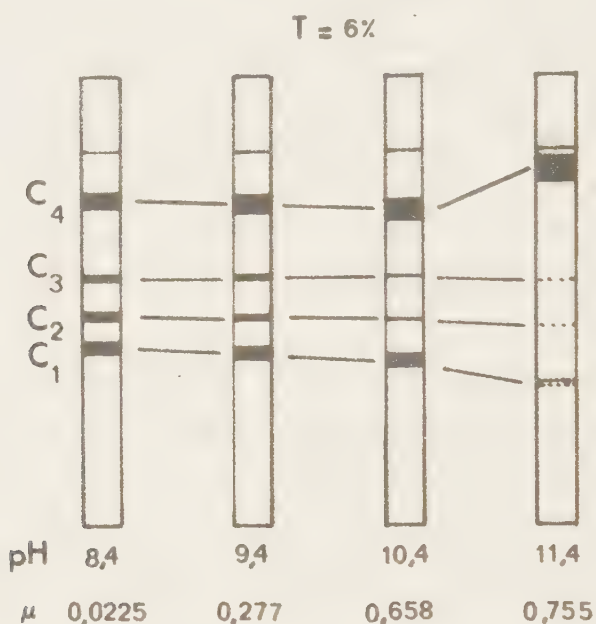


Fig. 8 : Electrophorèse en fonction du pH et de la force ionique.

La disparition des formes légères aux pH alcalins peut s'expliquer par leur conversion en C_4 . On observe en effet après électrophorèse à pH 11,4, l'intensification de la zone C_4 . Le processus peut faire intervenir des liaisons électrostatiques et la chute de la mobilité de C_4 à pH 11,4 peut être la conséquence d'un tel processus. La conversion en C_4 peut également résulter de l'oxydation alcaline d'éventuels groupements thiols libres des formes légères. Cette hypothèse implique que les deux dimères C_3 qui constituent C_4 soient liés par ponts disulfures. Si de telles liaisons s'établissent, elles doivent être particulièrement masquées puisque le β -mercaptoéthanol à pH 8,4 pour une force ionique de 0,0225 est sans action.

En présence de NaCl et pour des forces ioniques supérieures à 1, les formes C_1 , C_2 - C_3 disparaissent. Là encore, il pourrait y avoir eu conversion en tétramère. Ce résultat infirmerait nos précédentes conclusions sur la stabilité du système en fonction de la force ionique; mais il semble que l'activité de C_4 diminue lorsque la concentration de NaCl passe de 1 M à 3 M. La disparition des trois formes peut alors s'expliquer par leur dénaturation. La forme C_4 , plus active et de concentration plus élevée, résistant mieux à l'action dénaturante, reste alors la seule forme active.

5. ACTION DES SOLVANTS ORGANIQUES SUR L'ETAT D'AGREGATION.

L'électrophorèse du sérum ou des formes isolées pratiquée avec des tampons circulants contenant différentes proportions (de 100 à 500 ml/l) de propylène glycol, d'éthanol ou de dioxane, ne nous a pas montré de différences significatives avec l'interconvertibilité spontanée que l'on observe dans le tampon usuel (à partir de 500 ml d'éthanol, l'enzyme est dénaturée). Donc, si des liaisons hydrogène ou hydrophobes participent au maintien de la structure des formes de la BuChE, il ne semble pas qu'elles y jouent un rôle prépondérant.

6. ACTION DES ULTRASONS SUR L'ETAT D'AGREGATION.

L'action prolongée des ultrasons provoque d'intéressants effets sur l'activité et la répartition des formes de la BuChE.

- Au niveau de l'activité totale, mesurée au pH-stat, on observe une diminution régulière, en fonction du temps d'exposition aux ultrasons. La chute est plus rapide pour les sérums dont l'activité initiale est inférieure à la normale. D'une façon générale, on peut toutefois noter la relative résistance de l'enzyme aux ultrasons, puisqu'après 150 minutes de traitement, les sérums normaux présentent encore une activité de l'ordre de 25 à 30 % de l'activité initiale.

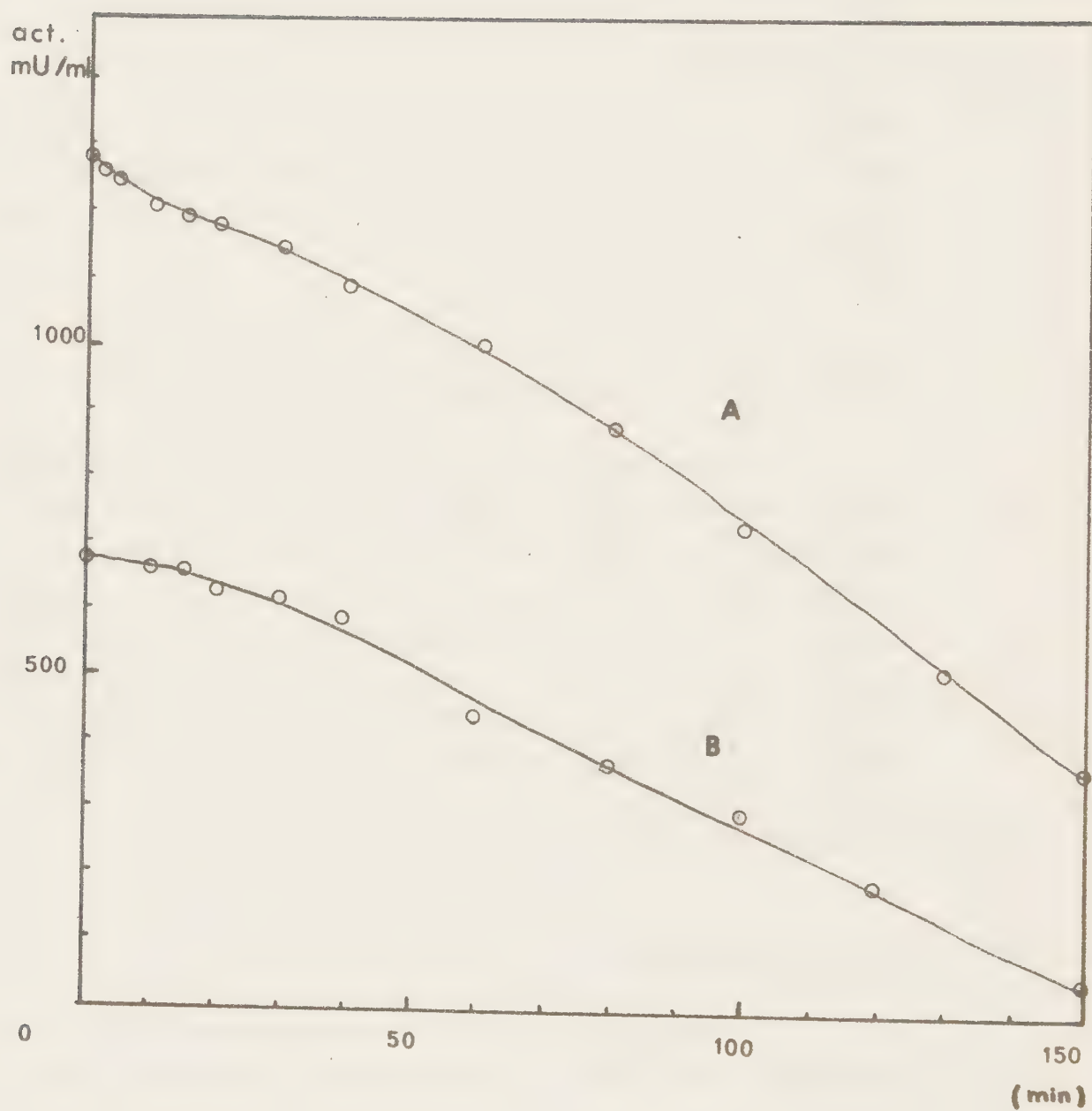


Fig. 9 : Diminution de l'activité totale en fonction du temps de sonication .

A - Sérum d'activité initiale normale.

B - Sérum d'activité initiale abaissée.

Les effets qui se manifestent au niveau de la répartition des quatre formes sont plus importants et plus significatifs. Les mesures densitométriques des gels révèlent la nature des modifications qui se produisent au cours des 20 premières minutes de traitement, en particulier au niveau des formes C_3 et C_4 .

Le diagramme représentant les pourcentages d'activité des 4 formes, en fonction du temps de sonication, nous montre :

- une importante décroissance de l'activité de la forme C_4 . Au cours des 20 premières minutes, elle diminue de moitié; elle se ralentit fortement ensuite et devient linéaire.

- Corrélativement, une augmentation importante de l'activité de la forme C_3 qui, en 20 minutes, passe de 9 % à plus de 35 %. A cette ascension rapide succède un plateau puis, au delà de 50 minutes, une nouvelle croissance plus faible mais linéaire.

- L'activité de la forme C_2 diminue régulièrement et s'annule pratiquement au bout de 120-150 minutes.

- Enfin, la forme C_1 présente également une augmentation d'activité, mais moins importante que celle de C_3 pendant les 20 premières minutes. Elle passe par un maximum vers la 40ème minute, puis décroît de façon régulière.

Essayons d'analyser la nature et l'enchaînement des phénomènes qui se produisent en fonction du temps de traitement.

- On peut distinguer trois phases de durées inégales et au cours desquelles les réactions mises en jeu semblent de nature différente : la première se déroule pendant les 20 premières minutes, la seconde approximativement entre la 20ème et la 50ème minute, enfin, la troisième phase débute vers la 50ème minute.

La première phase peut être appelée phase exponentielle. La désagrégation du tétramère engendre le dimère C_3 . L'augmentation de C_1 correspond à la dissociation de C_2 et probablement aussi à une légère désagrégation de C_3 .

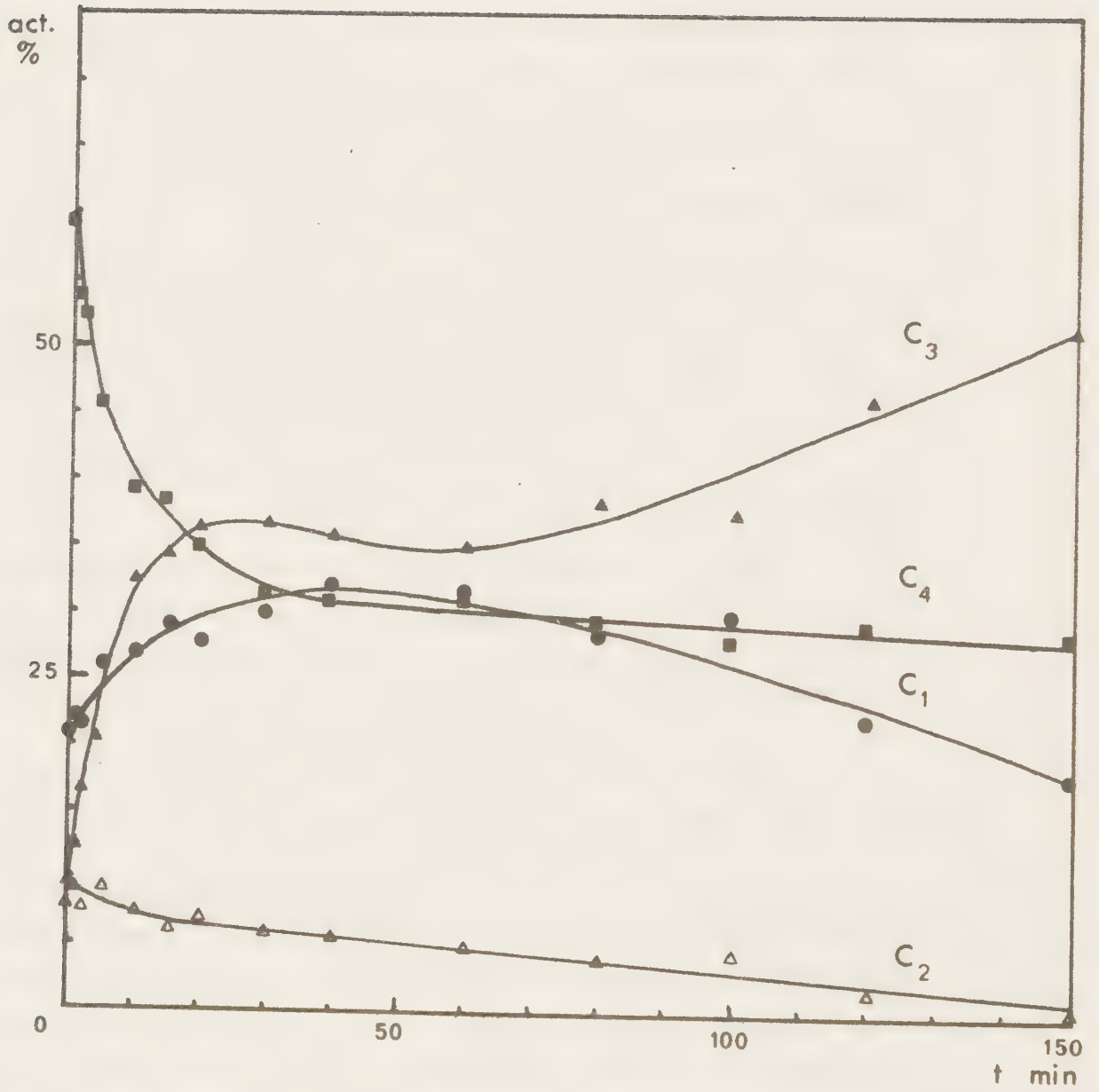
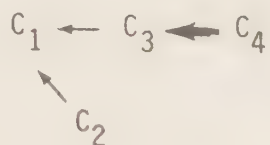
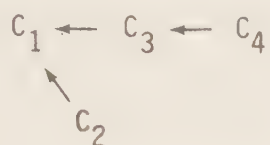


Fig.10 : Modification de la répartition des formes en fonction du temps de sonication .

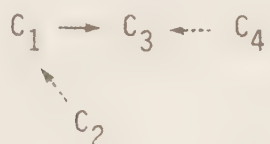
On peut donc écrire cette séquence de réactions consécutives comme suit :



La phase suivante est marquée par le ralentissement du processus de désagrégation du tétramère.



La troisième phase met en jeu des réactions différentes. La désagrégation du tétramère se produit à un rythme très faible et pourtant l'activité de C_3 augmente dans des proportions importantes. L'activité de C_1 par contre décroît. L'augmentation de C_3 ne s'explique donc que par la dimérisation de C_1 .



La diminution de l'activité totale de l'enzyme est donc le résultat de l'augmentation de formes moins actives (C_3) et de la dénaturation de l'enzyme par les ultrasons. Les réactions qui se produisent dans la solution et au niveau de l'enzyme entre la phase 1 et la phase 3 apparaissent de nature différente. Elles nous permettent d'apporter un élément nouveau sur la nature du type de liaisons qui associent les deux dimères dans le tétramère.

Il semble que ces liaisons soient relativement labiles puisque 50 % du tétramère est dissocié en 20 minutes. Ces liaisons ne semblent pas faire intervenir de ponts disulfures car, si les ultrasons provoquaient la rupture de telles liaisons, on n'observerait pas d'augmentation du dimère, la désagrégation de C_4 n'engendrerait que le monomère. Les réactions qui se produisent

au cours de la dernière phase confortent cette opinion. En effet, au cours de cette phase, nous observons une dimérisation de C_1 . Or, cette dimérisation en C_3 nécessite l'oxydation des groupements thiols libres de C_1 . La formation des ponts disulfures est une conséquence de l'action des ultrasons, liée à la libération dans le milieu de microbulles d'oxygène douées d'une énergie cinétique très grande et de radicaux libres oxydants. Si la formation de C_4 , par dimérisation de C_3 , impliquait l'établissement de ponts disulfures, on observerait une remontée de l'activité de C_4 . Or, celle-ci continue de baisser alors que, seule, celle de C_3 progresse. Donc, les liaisons qui s'établissent à l'interface des deux dimères dans la forme tétramérique, ne sont pas des ponts disulfures.

En raison des phénomènes d'interconvertibilité spontanée, il semble d'autre part exclu que ces liaisons soient de nature covalente. Il s'agit donc d'interactions faibles, électrostatiques, de Van der Waals, hydrogène ou hydrophobes, clivables par les ultrasons, mais en partie soustraites à l'influence du solvant. Ces liaisons doivent donc être nécessairement masquées. Ce masquage peut être le fait des chaînons hydrocarbonés de la copule glucidique ou dépendre de la présence à la surface de l'enzyme, de molécules étrangères interagissant de façon spécifique avec l'enzyme.

En conclusion, il apparaît que le système des formes multiples de la BuChE du sérum est d'une grande stabilité. L'état d'équilibre n'est modifié, de façon importante, qu'après un traitement drastique par les ultrasons.

Les ponts disulfures constituent les principales liaisons qui assurent la dimérisation. La stéréochimie de ces liaisons leur fait jouer un rôle important dans la stabilisation de la structure tertiaire; en imposant des restrictions dans la géométrie des oligomères, elle leur confère une grande rigidité et leur permet, probablement conjointement à la copule glucidique, de résister plus facilement que les autres protéines, aux variations physicochimiques du milieu.

6. RÉEXAMEN DU NOMBRE DE SITES ACTIFS PAR TETRAMERE .

Nous n'avions pu trancher entre 2 et 4 sites actifs pour le tétramère. Or, dans l'hypothèse où le tétramère n'aurait que 2 sites actifs, le déficit des deux autres pourrait provenir de leur masquage.

Dans l'hypothèse où deux sites seraient masqués (modèles III et IV), on peut envisager d'inhiber en totalité et irréversiblement l'activité cholinestérasique du sérum par un organophosphoré ; dans ce cas, l'action des ultrasons, après élimination de l'excès d'inhibiteur, en dissociant les formes tétramériques, devrait démasquer ces sites et restituer une certaine activité. Il est donc possible, de cette façon, d'opérer un choix entre le groupe de modèles III et IV et le groupe II, VI et VII.

Nous avons donc traité 15 ml de sérum par un organophosphoré. Notre choix s'est porté sur le DFP qui ne donne pas lieu à la réactivation spontanée de l'enzyme. Employé à la concentration de 10^{-4} M en solution dans le propylène glycol, il inhibe l'enzyme à 100 %, en 2 heures.

Nous avons ensuite éliminé l'excès d'inhibiteur par diafiltration sur membrane DIAFLO PM 10, contre 400 ml de tampon phosphate pH 6,2 - 0,067 M et concentré la solution dialysée jusqu'à 15 ml. Nous avons contrôlé l'efficacité de cette opération en testant le pouvoir inhibiteur des filtrats vis-à-vis d'un sérum témoin.

La sonication a été conduite dans les conditions opératoires décrites, sur une durée efficace totale de 150 minutes.

Les contrôles d'activité effectués au pH stat ou par la méthode de JUUL, après électrophorèse des parties aliquotes prélevées au cours de la sonication, se sont tous révélés négatifs.

Donc, les ultrasons, en dissociant la forme C_4 , ne dévoilent pas de sites cachés. On peut donc éliminer les modèles III et IV. Il reste donc 3 modèles possibles : II, VI et VII pour lesquels les sites sont tous exposés et accessibles au substrat.

Cependant, les expériences d'interconvertibilité et de dissociation nous ont montré que la forme C_2 n'engendre qu'une seule espèce moléculaire active : la forme C_1 ; son autre sous-unité est muette et l'on ne peut la mettre en évidence. Donc, la forme C_2 ne possède qu'un seul site actif et cela nous permet d'éliminer le modèle VII.

Il reste donc 2 modèles : le II et le VI .

Modèles	nombre de sites			
	C_1	C_2	C_3	C_4
II	1	1	1	2
VI	1	1	2	4

CHAPITRE VII

MODIFICATIONS ENZYMATIQUES

1. ACTION DE LA NEURAMINIDASE .

L'action de la NANase sur la BuChE se traduit par des modifications de l'état d'agrégation mais, quelle que soit la durée du traitement, l'activité cholinestérasique n'est pas modifiée.

On peut tirer une première conclusion : l'élimination des résidus d'acide N-acétyl neuraminique ne désorganise pas la structure du centre actif, donc, le NANA n'intervient pas dans la stabilisation de la conformation de cette région de l'enzyme.

Au niveau des formes multiples, le départ de NANA est à l'origine d'un bouleversement complet. L'action de la NANase a pu être suivie au cours du temps et l'on note après électrophorèse annulaire à $T = 8\%$:

- une diminution rapide de l'intensité de la forme C_1 , en même temps qu'un léger recul de sa mobilité. Au-delà de 90 minutes d'incubation, C_1 a totalement disparu;

- l'apparition d'une espèce moléculaire transitoire (C_0) dès la 15^{ème} minute, de mobilité intermédiaire entre C_1 et C_2 . Tandis que l'activité, donc la concentration, de cette forme s'intensifie sa mobilité décroît, pour devenir pratiquement identique à celle de C_2 . Cette forme finit, elle aussi, par disparaître au delà de 180 minutes;

- la forme C_2 résiste particulièrement bien à l'action de la NANase et sa mobilité ne décroît que légèrement.

- la forme C_3 voit sa mobilité et son intensité décroître régulièrement : elle a totalement disparu au-delà de 180 minutes.

- l'intensité de la forme C_4 semble légèrement augmenter : sa mobilité décroît et, après une incubation de plusieurs heures, on constate qu'elle n'a pratiquement pas migré dans le gel de séparation et qu'une activité assez intense est présente dans le gel de concentration. Ceci suggère qu'à la diminution de la mobilité est associée une augmentation de la masse moléculaire. Cette hypothèse est confirmée par l'électrophorèse en gradient de polyacrylamide (pratiquée après 24 heures d'incubation) qui révèle un recul de la forme C_4 de plusieurs millimètres, conséquence d'une augmentation de la masse moléculaire, ainsi qu'une importante trainée diffuse qui traduit l'existence de formes oligomériques de haut rang, extrêmement polydispersées.

L'électrophorèse en gradient de polyacrylamide montre par ailleurs :

- la persistance d'une forme C_2 légèrement en retrait par rapport à sa position à l'état natif;

- la présence de la forme liée à l' α_2 macroglobuline apparemment non modifiée dans la zone diffuse post C_4 .



Fig. 1 : Action de la neuraminidase en fonction du temps.
(électrophorèse annulaire à $T = 8\%$).

1. Sérum témoin
2. $t = 15-30$ min
3. $t = 90$ min
4. $t = 180$ min
5. $t = 24$ h

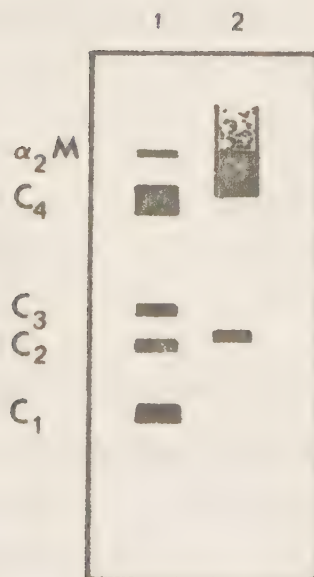


Fig. 2 : Electrophorèse en gradient
de polyacrylamide.

1. Sérum témoin
2. Après 24 h de
traitement
par la NANase .

L'électrophorèse à $T = 8\%$ des formes isolées soumises à l'action de la NANase confirme les résultats précédents et apporte des précisions supplémentaires.

- La forme C_1 disparaît en totalité; à sa place, on observe cette forme de mobilité intermédiaire entre C_1 et C_2 déjà mentionnée et une intense activité mais assez diffuse au niveau de C_4 .

- La mobilité de C_2 diminue légèrement.

- C_3 disparaît et, de façon analogue à C_1 , engendre une forme (ou un ensemble de formes) assez diffuse au niveau de C_4 .

- La mobilité de C_4 décroît et l'on remarque, dans le gel de concentration, plusieurs zones.



Fig. 3 : Electrophorèse à T = 8 % des formes multiples traitées par la NANase .

1. Sérum témoin
2. C_1 traitée
3. C_2 traitée
4. C_3 traitée
5. C_4 traitée

Ces résultats nous permettent de tirer 4 conclusions :

- La forme de mobilité intermédiaire C_0 entre C_1 et C_2 ne provient que de C_1 .

- C_1 et C_3 désialylées s'agrègent et donnent naissance à des formes lourdes et peu mobiles.

- C_4 désialylée voit sa mobilité diminuer et donne également naissance à plusieurs formes lourdes.

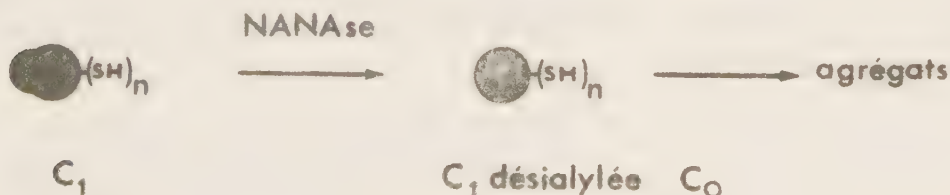
- C_2 est à peine modifiée; le départ des molécules de NANA constitutives de sa sous-unité C_1 n'entraîne qu'une légère

diminution de sa mobilité. Donc, la seconde sous-unité de C_2 , liée à la première, entre autres par un ou plusieurs ponts disulfures, apparaît être un facteur de stabilisation suffisant pour empêcher l'oligomérisation non spécifique qui semble être la tendance des trois autres formes lorsqu'elles sont désialylées.

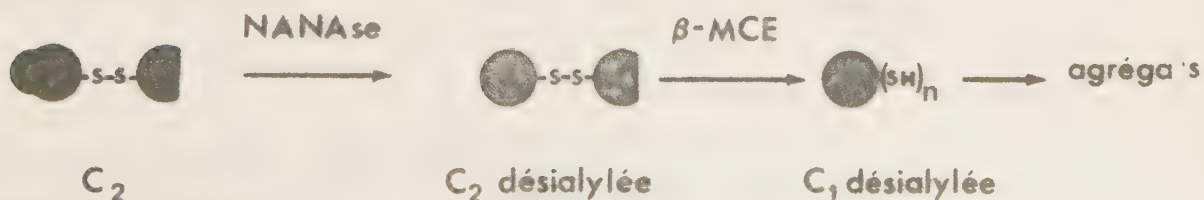
Si l'on traite au β -mercaptoéthanol un sérum sur lequel la NANase agit depuis 24 heures, on constate la disparition totale de la forme C_2 , mais la persistance des formes lourdes de mobilité inférieure à C_4 . Donc, à la différence de C_2 natif qui, par réduction, libère C_1 , la forme C_2 désialylée ne libère, en apparence, aucune forme légère :



En réalité, il y a quand même une forme active qui est libérée de C_2 désialylée, et cette forme correspond à C_1 désialylée, c'est-à-dire à C_0 . Or, nous avons vu que la désialylation de C_1 engendre des agrégats :



Il est donc logique de penser que la sous-unité C_1 désialylée, libérée de C_2 désialylée après réduction, engendre également de tels agrégats.



Notre hypothèse est facilement vérifiée : la forme C_2 individualisée, traitée par la neuraminidase, puis soumise à l'électrophorèse,

rèse en présence de β -mercaptoéthanol, disparaît mais une zone de faible activité est présente à l'entrée du gel de séparation.

Le problème qui reste à résoudre est celui de la forme transitoire (C_0) de mobilité intermédiaire entre C_1 et C_2 .

Cette forme qui apparaît entre la 15ème et la 30ème minute de traitement, de mobilité plus faible que C_1 , présente en outre un coefficient de retardement légèrement diminué. Il ne nous a pas été possible de déterminer sa perte de masse par rapport à C_1 (qui correspond théoriquement au nombre de résidus de NANA) car la détermination de M par la méthode d'HEDRICK & SMITH étant basée sur la mesure des mobilités relatives, une erreur sur la durée du traitement, sur la quantité de NANase ajoutée au sérum, ou une variation de la température d'incubation, entraînent une modification de la cinétique de libération des molécules d'acide N-acétylneuraminique, donc une erreur sur la mesure de la mobilité de cette forme. Il semble que l'élimination de l'acide N-acétylneuraminique soit lente. La mobilité de cette forme décroît régulièrement en même temps que sa concentration augmente et que celle de C_1 diminue. Elle finit par disparaître à son tour en s'autoagrégeant.

Donc, la formation des espèces de faible mobilité semble être la résultante de deux phénomènes consécutifs, touchant C_1 , C_3 et C_4 :

- leur désialylation sous l'action de la NANase;
- l'agrégation des formes désialylées à l'origine d'une multitude d'oligomères de rangs élevés. Ces oligomères ne semblent pas associés par des ponts disulfures puisque le β -MCE ne les dissocie pas (on peut objecter toutefois que ces liaisons, si elles existent, peuvent être masquées), mais paraissent plutôt résulter d'interactions plus ou moins spécifiques entre les unités monomériques désialylées.

En conclusion :

L'acide N-acétylneuraminique apparaît comme un facteur de stabilisation des structures tertiaire et quaternaire permettant la reconnaissance stéréospécifique des sites de liaison inter-sous-unités; son élimination déclenche un processus d'agrégation "aveugle"

des sous-unités désialylées aboutissant à la formation de gros agrégats polydispersés.

2. ACTION DE LA TRYPSINE .

Si l'on traite le sérum par des concentrations croissantes de trypsine (de 41,6 $\mu\text{g/ml}$ à 250 $\mu\text{g/ml}$) et que l'on fait varier la durée d'incubation, on observe, lorsque le temps de traitement et/ou la concentration d'enzyme augmente, une diminution constante de l'activité totale de l'enzyme.

Au niveau de la répartition des différentes formes, on assiste à un enchaînement de modifications (c.f. figure de la page suivante) :

- La forme C_1 augmente lentement, puis décroît.
- La forme C_2 disparaît très rapidement.
- La forme C_3 , après une diminution parallèle à celle de C_2 , augmente jusqu'à devenir presque aussi intense que C_1 puis, en même temps que cette dernière, amorce une nouvelle décroissance.
- La forme $C_{\text{pré } 4}$, pratiquement inexistante dans le sérum natif, augmente de façon très importante.
- La forme C_4 diminue lentement.
- La forme en interaction avec l' α_2 -macroglobuline disparaît en même temps que C_2 .

En électrophorèse annulaire sur gel de polyacrylamide, à $T = 6$ ou 8% , on observe en plus l'apparition, derrière C_4 , de formes $C_{\text{post } 4}$, de mobilité analogue à celles qui sont présentes dans les sérums anciens.

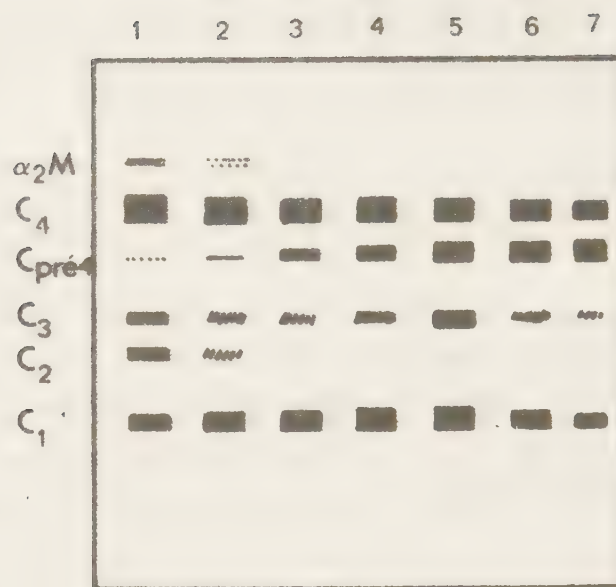


Fig. 4 : Electrophorèse sur plaque GRADIPORE du sérum traité par différentes concentrations de trypsine, à 37°C, pendant 15 minutes.

1. Sérum traité

2-7 Sérums traités

2. trypsine : 41,6 μg/ml

3. " 62,5 "

4. " 83,3 "

5. " 125 "

6. " 166,6 "

7. " 250 "

L'électrophorèse des formes individuelles traitées à la trypsine montre, en plus de leur interconvertibilité, le résultat de l'action de l'enzyme sur chacune d'elles. Dans tous les cas, on observe :

- une diminution de la forme originelle (et même pour C_2 une totale disparition);
- l'apparition de la forme $C_{\text{pré } 4}$.

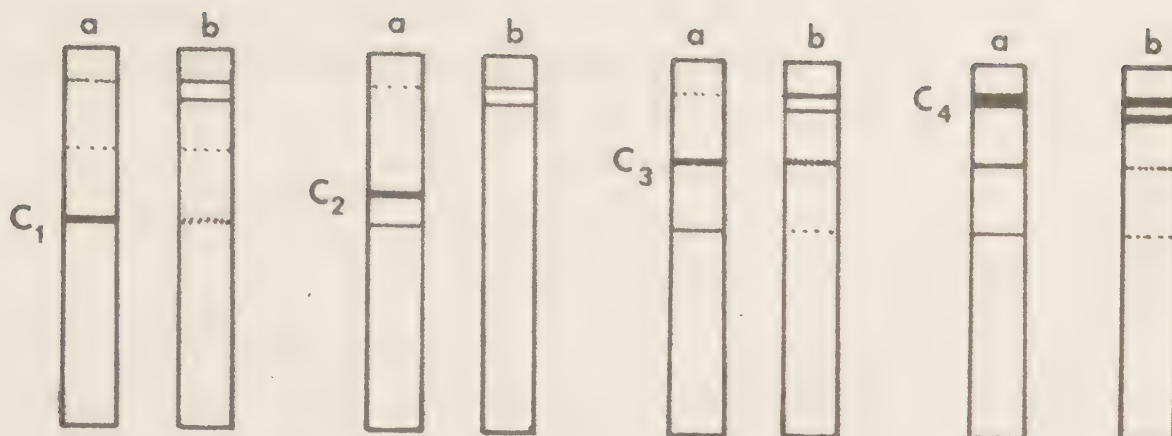


Fig. 5 : Electrophorèse à T = 8 % des formes individuelles de la BuChE.

- a - natives
- b - traitées par 30 µg de trypsine,
à 20°C, pendant 15 minutes.

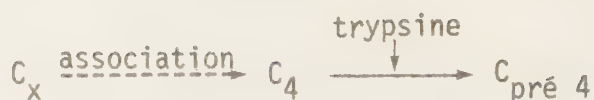
Essayons d'interpréter ces résultats. Il semble que trois phénomènes se produisent sous l'action de la trypsine :

- une protéolyse touchant chaque forme en un site précis;
- une protéolyse non spécifique;
- une dissociation des oligomères.

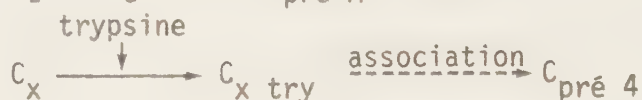
2.1. Protéolyse spécifique

Lorsque le temps d'incubation et la quantité de trypsine augmentent, la forme C_{pré 4} augmente d'intensité jusqu'à devenir aussi importante que C₄. Par ailleurs,, l'étude des formes individualisées nous montre que toutes engendrent C_{pré 4} sous l'action de la trypsine. La masse moléculaire de C_{pré 4} étant de l'ordre de 200000, on peut envisager deux hypothèses permettant d'expliquer la conversion des formes plus légères C₁, C₂, C₃ en C_{pré 4} .

a) l'interconvertibilité des formes entraînant dans tous les cas, un processus d'agrégation dont le terme final est C₄, c'est au niveau de celle-ci qu'agit la trypsine.



b) La trypsine agit en un point précis de chaque forme et engendre une espèce active qui, par autoassociation ou association avec C_1 ou C_3 , donne $C_{\text{pré } 4}$.



Il est difficile de se prononcer pour l'une ou l'autre de ces voies, mais on peut préciser un peu mieux la nature de $C_{\text{pré } 4}$. Spontanément, comme les autres formes, elle est sujette aux phénomènes d'interconvertibilité et engendre un peu de C_3 qui, en se dimérisant, donne C_4 . Traitée par la trypsine, la quantité de C_3 qu'elle libère est un peu plus grande et l'on note même la formation de traces de C_1 . On observe, en outre, l'apparition d'une bande $C_{\text{post } 4}$ qui peut, elle aussi, être interprétée comme un produit de protéolyse secondaire dérivé de $C_{\text{pré } 4}$.

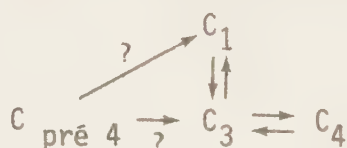


Fig. 6 : Electrophorèse à T = 8 % de la forme $C_{\text{pré } 4}$.

- a) native
- b) traitée par 30 μ g de trypsine, à 20°C pendant 15 minutes.

Donc, par analogie avec C_2 qui est un dimère diminué auquel il manque un fragment glucidopeptidique riche en NANA, la forme $C_{\text{pré } 4}$ apparaît comme un tétramère diminué dont certaines sous-unités, amputées d'un large fragment polypeptidique (qui provoque une perte globale de masse de l'ordre de 100000), ont perdu toute activité.

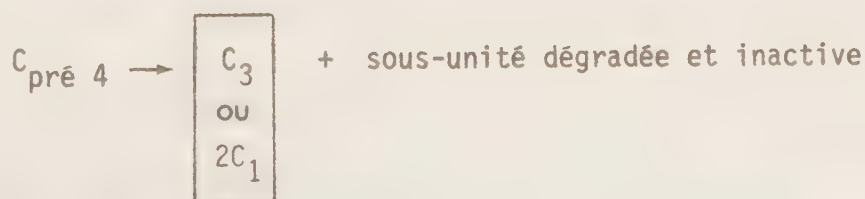
Cet effet de la trypsine sur les formes de la BuChE est à rapprocher de l'intensification de la forme $C_{\text{pré } 4}$ et de l'apparition de formes $C_{\text{post } 4}$ que l'on observe lorsque les sérums vieillissent. La protéolyse limitée, sous l'action d'enzymes "trypsine like", est peut-être, in vivo, une des voies du catabolisme de la BuChE.

2.2. Protéolyse non spécifique .

L'action de la trypsine ne semble pas se limiter au clivage spécifique d'une seule liaison peptidique. En effet, l'activité cholinestérasique totale diminue régulièrement au cours du temps et après une intensification des zones correspondant à C_1 et à C_3 , nous observons leur décroissance.

2.3. Dissociation des oligomères .

Corrélativement à l'intensification de $C_{\text{pré } 4}$, il y a augmentation de C_1 et de C_3 . Or, nous avons vu que l'action de la trypsine sur $C_{\text{pré } 4}$ semble augmenter le taux de dissociation de celle-ci.



Donc, on peut penser que l'attaque tryptique fragilise les zones d'interactions des deux types de sous-unités et favorise leur dissociation spontanée.

3. ACTION DES PHOSPHOLIPASES .

3.1. Phospholipase A₂ .

3.1.1. Phospholipase A₂ de venin de Bitis gabonica

La phospholipase A₂ de Bitis gabonica n'altère pas l'activité totale de l'enzyme mais provoque des modifications dans la répartition des formes multiples.

Si l'on augmente la quantité de phospholipase ou la durée d'incubation, on constate, après électrophorèse à T = 8 %, ou sur gel GRADIPORE :

- une légère mais constante augmentation de C₁;
- la disparition de C₂;
- la disparition quasi totale de C₃;
- l'intensification de la forme C_{pré 4} qui, pour une concentration de phospholipase de 1 mg/100 µl de sérum, devient aussi intense que C₄ après 1 h 30 d'incubation. Pour une concentration d'enzyme de 1 mg/1000 µl de sérum et un temps d'incubation de 24 heures, on obtient le même résultat;
- la forme C₄ ne semble pas modifiée.



Fig. 7 : Action de la Phospholipase A₂ de Bitis gabonica sur le sérum.

1 : témoin

2-3-4 : action de 1 mg d'enzyme pendant 1 h 30 sur 1000, 250 et 100 µl de sérum .

3.1.2. Phospholipase A₂ de venin de Naja

L'action de cette enzyme est moins importante que la précédente et n'entraîne qu'une diminution modérée de C₂ et de C₃.

3.1.3. Phospholipase A₂ de venin de Crotale

Dans nos conditions expérimentales, cette enzyme semble sans action.

Les effets de ces trois enzymes apparaissent fort différents mais il semble, toutefois, que les importantes modifications que l'on observe sous l'action de la phospholipase A₂ extraite du venin de Bitis gabonica et, dans une moindre mesure, avec l'enzyme de venin de Cobra, soient dues à des contaminants protéiques d'activité protéasique. En effet, les modifications qui surviennent dans la répartition des formes enzymatiques évoquent celles qui sont consécutives au traitement tryptique (la préparation de Bitis gabonica renferme une activité protéasique notable que nous avons estimée à 350 μ M de BAEE hydrolysées par minute et par milligramme mais, l'activité protéasique du venin de Cobra n'est que de 0,55 μ M/min/ml). D'autre part, la phospholipase A₂ de venin de Crotale dont la spécificité est la même que celle de venin de Cobra, et présentée comme d'une grande pureté et exempte d'activité protéasique, ne produit aucun effet sur les différentes formes de la BuChE. L'interprétation de ce dernier résultat doit être faite avec prudence. En effet, sa négativité ne signifie pas nécessairement l'absence de phospholipides liés aux formes de la BuChE, car les chaînes aliphatiques des acides gras peuvent interagir avec la chaîne polypeptidique en des zones hydrophobes plus ou moins masquées qui interdisent l'attaque hydrolytique de l'enzyme.

3.2. Phospholipase C .

3.2.1. Phospholipase C de Clostridium welchii

L'action de la phospholipase C de Clostridium welchii, à différentes concentrations et pendant des temps d'incubation variables, n'affecte pas l'activité totale de l'enzyme;

par contre, elle entraîne de profondes modifications au niveau de la nature et de la répartition des formes moléculaires de la BuChE (l'activité protéasique testée au BAEE est nulle).

- On observe une diminution progressive de la forme C_1 qui disparaît au bout de 24 heures d'incubation.

- La forme C_2 est stable et ne semble pas affectée par ce traitement.

- Par contre, la forme C_3 diminue très rapidement d'intensité et disparaît au-delà de 6 heures.

- La forme C_4 ne semble pas touchée dans son activité mais, en gradient de polyacrylamide, on constate un léger recul de sa distance de migration. La forme liée à l' α_2 -macroglobuline n'est pas modifiée, mais une importante traînée suit C_4 jusqu'à l'origine, une intense activité correspondant à des formes qui ne peuvent pénétrer dans le gel reste au niveau du dépôt.

L'action de cette enzyme est, au premier abord d'interprétation difficile. Plusieurs phénomènes qui semblent être de nature différente se produisent simultanément. Essayons de les relier.

La rapide disparition de C_3 et celle plus lente de son monomère C_1 , sembleraient indiquer qu'une pièce phospholipidique, présente à la surface de ces formes, joue un rôle dans la stabilisation de leur conformation. L'apparition concomitante d'une traînée derrière la forme C_4 , analogue à celle que l'on observe après traitement à la NANase, évoque également la formation d'agrégats dont les sous-unités s'associent au hasard et conduisent à un système très polydispersé, dont les masses moléculaires s'étagent de 400000 à plusieurs millions.

L'analogie avec l'action de la neuraminidase va plus loin; on observe, en effet, la même diminution de mobilité de C_4 et, apparemment, aucune modification de C_2

L'origine de l'espèce moléculaire transitoire qui apparaît entre C_1 et C_2 reste, pour nous, sans explication pour le moment. Nous avons déterminé sa masse moléculaire et l'estimons à 132000 ± 8000 .

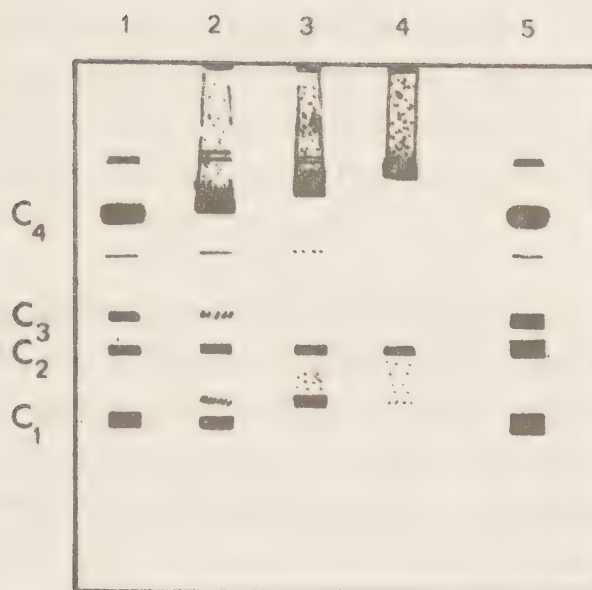


Fig. 8 : Action des deux phospholipases C sur le sérum .

1. Sérum témoin
- 2,3,4. Sérum traité par la phospholipase C de Cl.welchii pendant 3 h, 6 h, 24 h.
5. Sérum traité par la phospholipase C de B. cereus pendant 24 h.

3.2.2. Phospholipase C de B.cereus

Après un temps d'incubation de 3 heures, contrairement à ce que l'on observe avec l'enzyme précédente, on ne note aucune modification de la répartition des formes de la BuChE; l'activité totale de l'enzyme n'est pas modifiée. Par contre, si l'on poursuit le traitement au-delà de 6 heures, les modifications que l'on enregistre apparaissent d'une grande importance.

- Au niveau de l'activité totale de l'enzyme mesurée au pH-stat, on constate une augmentation de l'ordre de 10 à 11 % par rapport au sérum témoin.

- Après électrophorèse, les zones correspondant aux formes C₁, C₂ et C₃ sont plus intenses que chez le témoin. D'autre part, si l'on suit la cinétique d'apparition des complexes blancs de thiocho-

line - cuivre, on constate qu'avec les sérums traités, les zones C_1 , C_2 , C_3 apparaissent au bout de temps plus courts que chez les témoins, et que leur intensité est beaucoup plus forte après 90 minutes. Des études sont en cours afin de quantifier ce phénomène, mais l'on peut déjà écrire les quelques réflexions qu'il nous inspire.

- L'activité de la forme C_4 ne semble pas (ou très peu) affectée par le phénomène d'activation que l'on observe, après électrophorèse, pour les trois autres formes. Il semble donc exclu que l'augmentation de l'activité de celles-ci provienne de la désagrégation de C_4 et nous avons pour cela deux autres arguments:

- l'activité totale du sérum subit une augmentation; or, la dissociation de C_4 en ses sous-unités ne peut qu'aboutir à une diminution de l'activité puisque ces formes (C_1 et C_3) sont moins actives que le tétramère.

- C_2 est aussi augmentée; or, nous avons démontré en plusieurs circonstances sa non-appartenance à la famille $C_1 - C_3 - C_4$.

Donc, l'activité des formes C_1 , C_2 et C_3 ne peut être que la conséquence d'une modification survenue au niveau de leur centre actif. L'hypothèse qui se présente à notre esprit est la suivante: un ou plusieurs phospholipides interagissent avec les monomères de la BuChE et déterminent des tensions responsables de la déformation du centre actif et du K_m apparent élevé des trois formes légères de l'enzyme. La phospholipase C, en provoquant l'hydrolyse de ces molécules phospholipidiques, libère les centres actifs de leur carcan, et permet aux trois formes de fonctionner normalement.

Cette explication est, certes, séduisante car elle laisse entrevoir la possibilité d'une modulation de l'activité par l'intermédiaire des phospholipides, mais elle ignore le C_4 . Est-il en interaction avec des phospholipides et, si oui, pourquoi leur élimination n'affecte pas son activité? Nous ne pouvons répondre à cette question pour le moment, mais nos recherches en cours sont orientées

dans cette direction et nous espérons obtenir, dans un proche avenir, des données constructives.

3.3. Phospholipase D .

Quelles que soient les conditions de traitement, la phospholipase D s'est avérée sans action sur les formes multiples de la BuChE. Dans sa négativité, ce résultat est intéressant et démontre que le ou les phospholipides qui interagissent avec les formes de la BuChE ne sont probablement pas des phosphatidylcholines. On pouvait, en effet, concevoir que l'interaction enzyme-phospholipide s'établisse, notamment, au niveau du centre actif entre l'ammonium quaternaire de la choline et le site anionique.

CHAPITRE VIII

OBSERVATIONS SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE

Ce dernier chapitre n'est supporté par aucun travail expérimental; il est le fruit d'une exploitation théorique de certains de nos résultats et de données publiées ces dernières années.

Ce travail apporte un soutien à certaines de nos conclusions et constitue une ouverture sur la discussion objet du dernier volet de notre étude.

1. NOMBRE THEORIQUE D'AMINOACIDES .

La mesure de la masse moléculaire du monomère (84800 ± 5800) nous permet d'accéder au nombre d'acides aminés constituant la chaîne polypeptidique après la détermination préalable de la conformation du complexe monomère-SDS.

Le traitement théorique nous a été apporté par REYNOLDS & TANFORD (1970). Ces auteurs admettant que les complexes polypeptide-SDS ont la forme d'ellipsoïdes de révolution très allongés (en cigare ou en bâtonnet), ont pu calculer leurs rapports axiaux à partir de l'équation de SIMHA qui exprime la relation existant entre le facteur de forme de SIMHA et le rapport axial a/b (TANFORD, 1961, pp 335-336 & 391).

Connaissant le volume de la particule, il est ensuite possible de calculer son rayon de STOKES à partir de l'équation :

$$\frac{M}{\rho} (\bar{v} + \delta_1 v_1^o + \delta_2 v_2^o) = \frac{4}{3} \pi a b^2 = \frac{4}{3} \pi R_S^3$$
 dans laquelle :

$\bar{v}$ = le volume spécifique partiel de la protéine.

$\delta_1 = \omega$ = la quantité d'eau (g) fixée par gramme de protéine.

L'hydratation des protéines globulaires est fréquemment choisie arbitrairement égale à 0,2 g/g mais, dans le cas présent, la chaîne polypeptidique étant complètement dénaturée, cette valeur n'a plus aucune signification. La quantité d'eau fixée à la protéine correspond, en fait, à l'hydratation des micelles de SDS. Celle-ci dépend de la force ionique du tampon de dissociation. Ainsi, pour un tampon dont la force ionique est de 0,0236, on aura une fixation de 0,9 g d'eau pour un taux de fixation δ_2 en SDS de 1,4 g par gramme de protéine.

v_1^o = volume spécifique partiel de l'eau = 1 ml.g⁻¹

δ_2 = 1,4 g/g

v_2^o = volume spécifique partiel du SDS = 0,886 ml.g⁻¹

soit :

$$F = \frac{M}{\rho} (\bar{v} + 2,140) = \frac{4}{3} \pi a b^2 = \frac{4}{3} \pi R_S^3$$

d'où l'on tire le rayon de STOKES du complexe :

$$R_S = (a b^2)^{1/3} = \left(\frac{3 F}{4 \pi} \right)^{1/3}$$

Or, les études hydrodynamiques de REYNOLDS & TANFORD montrent que le petit axe b est approximativement constant pour tous les complexes polypeptides-SDS et oscille autour de 18 Å et qu'il existe une relation linéaire entre le grand axe a et la masse moléculaire.

On peut donc calculer a :

$$a = \frac{3F}{4 \pi b^2}$$

La longueur de chaque ellipsoïde, $2a$, est directement proportionnelle au nombre d'acides aminés. Les auteurs ont calculé que chaque acide aminé occupe un segment de $0,74 \text{ \AA}$ sur la longueur du bâtonnet.

Le nombre d'acides aminés (n) peut donc être estimé égal à :

$$n = \frac{2a}{0,74}$$

Enfin, connaissant la valeur moyenne du volume spécifique partiel du monomère déterminée expérimentalement $\bar{v} = 0,720 \text{ ml.g}^{-1}$, on peut calculer :

$$\begin{aligned} F &= 40220 \cdot 10^{-23} \\ R_S &= 45,79 \cdot 10^{-8} \text{ cm} = 45,8 \text{ \AA} \\ a &= 296,5 \cdot 10^{-8} \text{ cm} = 296,5 \text{ \AA} \end{aligned}$$

d'où, un grand axe $2a = 593 \text{ \AA}$.

Le nombre d'acides aminés est évalué par ce calcul à environ 800 par monomère. Cette valeur excessive doit être discutée et critiquée pour deux raisons : la BuChE est de nature glycoprotéique et sa dénaturation par le SDS ne permet pas d'effectuer de distinction entre la partie glucidique et la chaîne polypeptidique.

2. COMPOSITION PROBABLE DE LA PARTIE GLUCIDIQUE .

Le pourcentage de glucides déterminé par HAUPT et al. (1966) nous a déjà servi à calculer la contribution de la partie glucidique au volume spécifique partiel théorique. Connaissant la masse moléculaire de l'enzyme, nous l'avons également mis à profit pour estimer le nombre probable de chaque sucre et, à partir de ce résultat, le nombre et la longueur des chaînes glucidiques.

La masse moléculaire du monomère, à laquelle nous avons eu accès par électrophorèse en présence de SDS, étant estimée à

84800 $\pm$ 5800, celle du tétramère est donc quatre fois plus élevée, soit 339000 $\pm$ 23200. On peut ainsi évaluer le nombre de sucres, et dérivés, que C₄ doit théoriquement posséder et le comparer avec le nombre d'acides aminés maximum de 800 X 4 = 3200.

Ainsi, pour une masse moléculaire totale de 339000, il revient à la fraction glucidique (23,9 %), une masse de 81000 $\pm$ 5500.

Le nombre $\bar{n}_i$ d'éléments d'une catégorie de résidus glucidiques représentant x_i % du total glucidique et dont la masse moléculaire est M'_i sera :

$$\bar{n}_i = \frac{81000 \cdot x_i}{100 \cdot M'_i}$$

En admettant que chaque résidu est associé avec ses deux voisins par liaisons osidiques, et qu'il n'y a pas de branchements latéraux (ce qui est inexact car certaines chaînes sont probablement ramifiées, mais l'erreur que nous introduisons est faible), on a $M'_i = M_i - 18$, sauf pour l'acide N-acétyl neuraminique qui occupe toujours une position terminale et dont $M'_i = M_i - 1$.

Ainsi :

	P_i (%)	x_i (%)	M_i	M'_i	$\bar{n}_i$
Hexoses (D-gal, D-Man, D-Glc) -----	9,3	39	180,16	162,16	195
N-Acétyl hexosamines ----	8,4	35	221,16	203,16	139
NANA -----	6,0	25	267,24	266,24	76
Fucose -----	0,2	0,8	164,16	146,16	4
Σ	23,9	100			414

Ainsi, le C₄ compte une moyenne de 414 résidus glucidiques dans sa molécule. Le nombre d'acides aminés est donc nécessairement inférieur

à 3200, mais également inférieur à $3200 - 414 = 2786$, étant donné que le volume molaire (Φ_i) des aminoacides est plus faible que celui des sucres.

$$\Phi_i = \nu_i \cdot M_i \text{ (cm}^3\text{)}$$

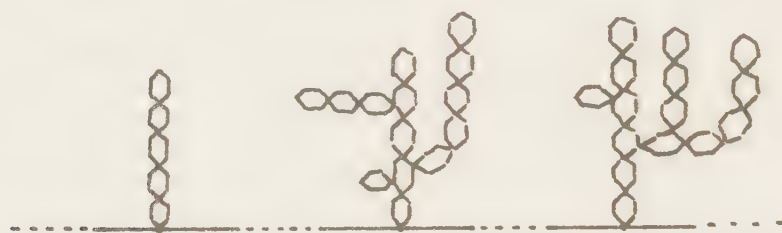
	$\bar{n}_i$	ν_i	Φ_i	$n_i \Phi_i$
Hexoses -----	195	0,613	99,40	19383
N-Acétyle hexosamines	139	0,666	135,30	18806
NANA -----	76	0,584	155,48	11816
Fucose -----	4	0,678	99,09	396
Σ	414			50400

On peut déterminer le volume molaire apparent de C_4 à partir des valeurs théorique et expérimentale du volume spécifique partiel et, connaissant le volume molaire de la partie glucidique $\Phi_g = 50 \cdot 10^3 \text{ cm}^3$, en déduire le volume molaire de la chaîne polypeptidique (Φ_p). Le volume molaire apparent moyen d'un résidu aminoacide (Φ_{aa}) étant estimé à $80,50 \text{ cm}^3$ (COHN & EDSALL, 1943, p. 372), on obtient facilement le nombre d'acides aminés de la chaîne polypeptidique :

$$n_{aa} = \frac{\Phi_p}{\Phi_{aa}}$$

	$\nu_{C_4} \text{ théor.} = 0,703$	$\nu_{C_4} \text{ exp.} = 0,724$
Φ_{C_4}	$238 \cdot 10^3$	$245 \cdot 10^3$
Φ_g	$50 \cdot 10^3$	$50 \cdot 10^3$
Φ_p	$188 \cdot 10^3$	$195 \cdot 10^3$
n_{aa}	2335	2422

Revenons à la composition de la copule glucidique. L'acide N-acétyl neuraminique, ainsi que le fucose, occupant toujours une position terminale et les chaînes glucidiques des glycoprotéines sériques étant simples, mais le plus souvent ramifiées (KORNFELD & KORNFELD, 1976), on peut affirmer que leur nombre sera compris entre 80 (si toutes les chaînes sont simples) et 20 (si toutes les chaînes portent au maximum 3 ramification). La longueur de chaque chaîne oscillera donc entre 5 et 20 résidus.



Ce grand nombre de chaînes glucidiques terminées par des unités d'acide N-acétyl neuraminique, ionisées au pH physiologique, détermine un champ de répulsion électrostatique qui doit contribuer, de façon très significative, à l'extension de la protéine en une structure relativement linéaire, telle qu'elle apparaît par ses propriétés hydrodynamiques et telle que les modèles moléculaires nous permettent de l'imaginer.

3. RELATIONS ENTRE LA COMPOSITION EN AMINOACIDES ET LA STRUCTURE DE LA BuChE .

Certains travaux ont permis d'établir des corrélations entre la composition en aminoacides des protéines et leur structure.

- Les travaux de FISHER (1964) ont notamment démontré l'importance des groupes polaires et non polaires dans l'édification des structures tertiaire et quaternaire des protéines en solution (YON, 1969, p.99).

- Les études comparatives de VANDERKOOI & CAPALDI (1972) ont fait ressortir que les compositions en aminoacides des protéines non membranaires diffèrent statistiquement de celles des protéines membranaires.

Les formes multiples de la BuChE du sérum humain, du moins C₁, C₃ et C₄ représentant les différents niveaux de la structure quaternaire de l'enzyme, les travaux de FISHER doivent nous permettre de mesurer l'importance de la contribution des aminoacides dans la tendance à l'oligomérisation. Enfin, à partir du calcul des pourcentages de polarité de VANDERKOOI & CAPALDI, il doit être possible de répondre à cette interrogation : la BuChE, enzyme sérique, présente-t-elle toutes les caractéristiques d'une enzyme soluble ou, en prenant modèle sur les AChE des érythrocytes et du système nerveux, renferme-t-elle la potentialité d'une intégration membranaire ?

Pour résoudre ces deux problèmes, nous nous sommes référé une nouvelle fois à la composition en aminoacides de la forme C₄, déterminée par MUENSCH et al. (1976).

3.1. Relation entre la composition en aminoacides et la structure quaternaire .

3.1.1. Théorie de Fisher

Le fait que les protéines sériques soient hydro-solubles, nous conduit à admettre implicitement que les résidus polaires sont périphériques et que les chaînes hydrophobes occupent une position interne.

VAUGH (1954) a, le premier, formulé le concept de volume externe hydrophile (V_e) et de volume interne hydrophobe (V_i); FISHER (1964) développant cette idée, a montré que le rapport de ces deux volumes, le rapport de polarité p, détermine pour une part importante les structures tertiaire et quaternaire des protéines.

$$p = \frac{V_e}{V_i}$$

En nous ramenant au volume total de la sphère équivalente de rayon $\bar{R}$

$$V_t = \frac{4}{3} \pi \bar{R}^3 = V_e + V_i$$

On détermine le volume externe :

$$V_e = \frac{4}{3} \pi [\bar{R}^3 - (\bar{R} - d)^3]$$

d représente l'épaisseur de la couche hydrophyle externe. Cette épaisseur, que l'auteur estime constante, est de l'ordre de $4 \text{ \AA}$.

Le volume interne est :

$$V_i = \frac{4}{3} \pi (\bar{R} - d)^3$$

Dans le cas de la sphère, le rapport de ces deux volumes représente la valeur minimale du rapport de polarité, soit P_s :

$$P_s = \frac{\bar{R}^3}{(\bar{R} - d)^3} - 1$$

Le tracé de la courbe $P_s = f(V_t)$ représente le cas limite des protéines compactes et de forme sphérique.

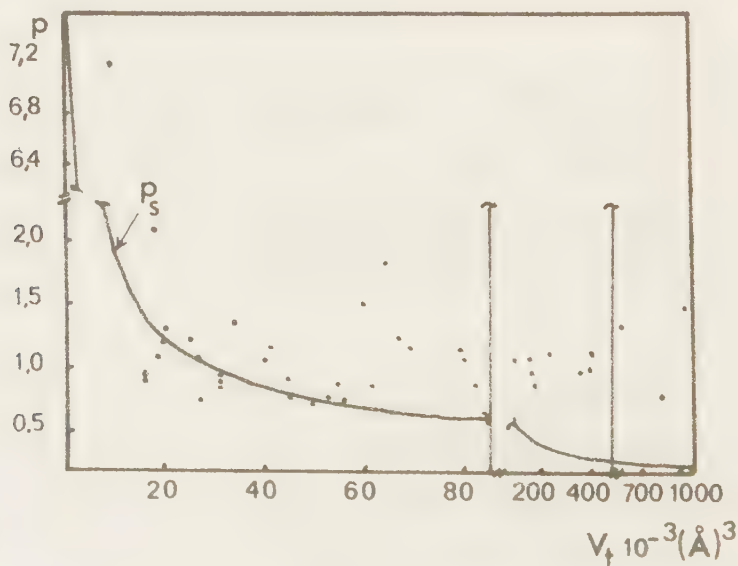


Fig. 1 : Relation entre le rapport de polarité et le volume total.

En réalité, peu de protéines satisfont à ce modèle et les valeurs expérimentales de $p = f(V_t)$ s'écartent notablement du tracé théorique.

On calcule p à partir des volumes spécifiques des résidus aminoacides déterminés par VAUGH (1954, p.344). En accord avec NEMETHY & SCHERAGA (1962), les résidus arg, lys, his, asp, glu, ser, thr et tyr sont considérés comme polaires.

- Lorsque $p < P_s$, le nombre de résidus hydrophobes est en excès par rapport à la valeur idéale et la probabilité de formation des oligomères associés par des liaisons hydrophobes est élevée.

- Lorsque $p > P_s$, les protéines ont tendance à s'allonger, afin que tous les groupements polaires soient en contact avec la phase aqueuse.

3.1.2. Application à la BuChE

La composition en aminoacides de la forme C_4 déterminée par MUENSCH et al. (1976) nous a permis de déterminer V_e , V_i et V_t (le volume total de la partie protéique de l'enzyme). Les aminoacides ont été classés en deux catégories polaires et non-polaires et leurs volumes calculés dans le tableau suivant :

		Volume des aminoacides ($\text{\AA}^3$)	Nombre de résidus par molécule de C_4	Volume des n_i résidus ($n_i v_i$)	
polaires	Asp	58,4	222	12964,8	$V_e = \sum n_i v_i = 102867,9 \text{ \AA}^3$
	Glu	85,5	223	19066,5	
	Ser	36,0	155	5580	
	Thr	63,1	119	7508,9	
	Tyr	138,8	119	16517,2	
	His	89,0	42	3738	
	Lys	121,0	180	21780	
	Arg	125,7	125	15712,5	
non polaires	Pro	81,0	104	8424	$V_i = \sum n_i v_i = 88008,6 \text{ \AA}^3$
	Gly	5,1	233	1188,3	
	Ala	32,2	177	5699,4	
	Cys	52,8	32	1689,6	
	Val	86,3	112	9665,6	
	Met	112,1	25	2802,5	
	Ile	113,4	91	10319,4	
	Leu	113,4	172	19504,8	
	Phe	136,6	110	15026	
	Try	175,5	78	13689	

Le volume total de la partie protéique de C_4 est donc :

$$V_t = V_e + V_i = 190876,5 \text{ \AA}^3$$

et son rapport de polarité :

$$p = \frac{V_e}{V_i} = 1,168.$$

Les formes C_1 et C_3 ont le même rapport de polarité.

En prenant le rayon de la sphère anhydre équivalente à C_4 égal à 44,7 Å, on calcule son Ps , soit 0,324. Pour C_3 , on obtient 0,42 et pour C_1 : 0,56 .

Donc, pour les trois formes $P > Ps$, l'écart entre ces deux valeurs est en réalité beaucoup plus important car notre enzyme est une glycoprotéine et nous n'avons pas pris en compte la copule glucidique hydrophile qui augmente encore le volume externe.

Ainsi, avec un rapport de polarité vraisemblablement 3 à 5 fois supérieur au Ps , il apparaît que la probabilité d'oligomérisation par interaction hydrophobe est pratiquement nulle et que l'enzyme doit avoir une forme très allongée. Nos résultats expérimentaux ne démentent pas ces deux points.

- Le système de formes multiples de l'enzyme, en particulier C_1 , C_3 , C_4 que nous avons définis comme étant les différents niveaux d'une structure quaternaire covalente, résulte d'un processus d'oligomérisation : les interactions faibles, en particulier hydrophobes entre les sous-unités ne sont certainement pas les principaux facteurs stabilisants et YON (1969, p. 102 et suivantes), sans nier l'importance du rapport de polarité, a raison de souligner le rôle des autres éléments et, en particulier, des ponts disulfures, dans l'édification et la stabilisation des structures tertiaire et quaternaire. Les ponts disulfures nous sont effectivement apparus être les principaux facteurs de l'existence et du maintien des formes multiples de la BuChE.

- Sur le second point, les propriétés hydrodynamiques et le modèle moléculaire que nous avons établi présentent, en effet, l'enzyme tétramérique sous une forme allongée.

3.2. Comparaison de la composition en aminoacides de la BuChE avec celle des protéines membranaires .

3.2.1. Fondement théorique

A partir des compositions en aminoacides des protéines membranaires et non membranaires données par le Handbook of Biochemistry et en classant leurs aminoacides en 3 catégories : hydrophiles,

intermédiaires et hydrophobes, VANDERKOOI & CAPALDI (1972) ont déterminé, pour chaque protéine, un pourcentage de polarité. Il ressort de cette étude que les pourcentages de polarité des deux classes de protéines diffèrent statistiquement.

Classification des résidus aminoacides

Hydrophiles	Intermédiaires	Hydrophobes	
Asp + Asn	Ser	Ala	Met
Glu + Gln	Thr	Val	Pro
Lys	Tyr	Leu	Phé
Arg	His	Ile	Trp
	Gly	Cys	

Les pourcentages de polarité sont calculés en faisant la somme de la fraction molaire des résidus hydrophiles (h) plus la demi-somme de la fraction des résidus de polarité intermédiaire (i)

$$\begin{aligned}
 p \% &= \left[\sum f_h + \frac{\sum f_i}{2} \right] \times 100 \\
 &= \frac{\sum (n_i M_i)_h + \frac{\sum (n_i M_i)_i}{2}}{\sum (n_i M_i)_{\text{totaux}}}
 \end{aligned}$$

Sur 206 protéines non membranaires testées, 87 % présentent un pourcentage de polarité de 46 ± 6 % (les apoprotéines des lipoprotéines sériques ont des pourcentages compris entre 46 et 52). Les protéines membranaires extrinsèques ont des pourcentages de polarité supérieurs à 45 %, mais les protéines intrinsèques hydrophobes montrent toutes des pourcentages inférieurs à 40 %.

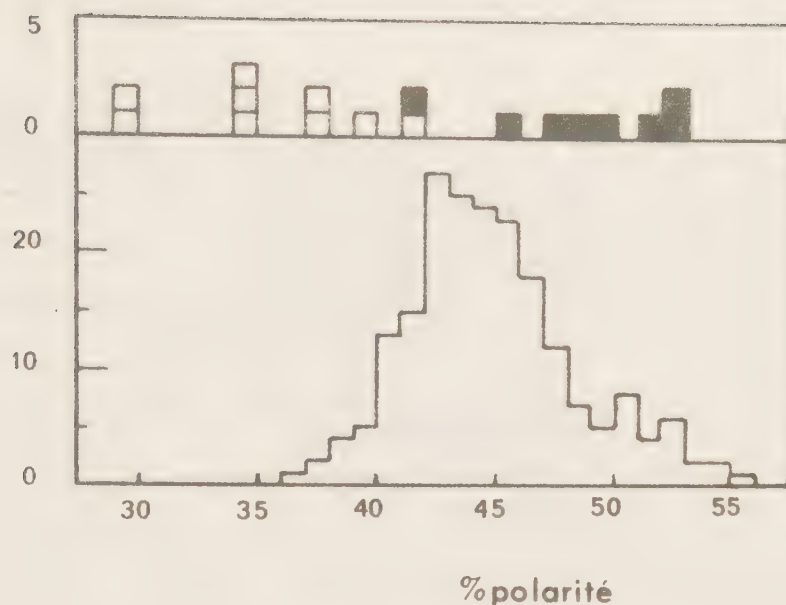


Fig. 2 : Pourcentage de polarité des protéines.

L'histogramme de la partie inférieure du schéma représente les pourcentages de polarité des protéines non membranaires; à la partie supérieure, chaque case représente une protéine membranaire : en blanc, les protéines intrinsèques dont la composition est connue, en noir, les protéines extrinsèques.

3.2.2. Application à la BuChE

Sur la base des données de MUENSCH et al. (1976) , nous avons calculé le pourcentage de polarité des aminoacides de la forme de C_4 de la BuChE du sérum humain (le p % des formes C_1 et C_3 est identique). Cette valeur a été ensuite comparée aux pourcentages obtenus avec la BuChE du sérum de cheval, à partir des données de TENG et al. (1976), avec la BuChE de la glande parotide du porc (TUCCI & SEIFTER, 1969) avec l'ACHé 11S de *Torpedo marmorata* (ROSENBERRY, 1975, p. 145), et enfin avec l'ACHé des érythrocytes de boeuf (ROSENBERRY, 1975, p. 145). Les compositions en aminoacides de ces différentes cholinestérases sont consignées dans le tableau de la page 329.

Le tableau ci-dessous donne les pourcentages de polarité des aminoacides de ces cinq enzymes.

ENZYMES	POURCENTAGES DE POLARITE
BuChE sérum humain	48,91
BuChE sérum de cheval	47,69
BuChE glande parotide de porc	50,44
AChE organe électrique de Torpedo marmorata	46,27
AChE membrane des érythro- cytes de boeuf	49,30

Nous voyons que le pourcentage de polarité des aminoacides de la BuChE du sérum humain est absolument conforme à celui des protéines non membranaires. Si l'on avait déterminé le pourcentage de polarité total en tenant compte à la fois des aminoacides et des résidus sucrés, la valeur que l'on aurait obtenue aurait été encore plus élevée. Cette remarque est valable également pour les autres cholinestérases dont on a omis de prendre en compte la partie glucidique.

A propos des deux acétylcholinestérases, enzymes appartenant à des structures membranaires, leurs pourcentages de polarité, supérieur à 45 %, les range parmi les protéines membranaires extrinsèques.

Donc, la BuChE du sérum humain présentant toutes les caractéristiques d'une protéine non membranaire, en admettant qu'elle puisse se lier à des structures membranaires (par exemple sur les endothéliums des vaisseaux capillaires, comme cela a été suggéré), il lui est thermodynamiquement impossible de s'intégrer à l'intérieur de la membrane, voire de la traverser; elle ne peut, tout au plus, se fixer (sur des sites spécifiques?) qu'en surface.

			BuChE sérum humain		BuChE sérum de cheval		BuChE glande parotide de porc		AchE 11 S Torpedo- marmorata (*)		AchE érythrocytes de boeuf (*)	
	Amino- acide	M _i	n _i	f %	n _i	f %	n _i	f %	n _i	f %	n _i	f %
polaires	Asp	133,5	222	9,73	63	11,25	340	12,34	68	11,07	46	8,41
	Glu	147,1	223	10,81	64	12,64	337	13,51	69	12,42	65	13,14
	Lys	146,2	180	8,67	34	6,67	156	6,22	31	5,54	37	7,43
	Arg	174,2	125	7,17	30	7,01	130	6,17	29	6,18	25	5,99
intermé- diaires	Ser	105,1	155	5,37	35	4,94	263	7,54	51	6,56	63	9,10
	Thr	119,1	119	4,67	32	5,11	156	5,07	26	3,79	31	5,07
	Tyr	181,2	119	7,10	20	4,86	62	3,06	17	3,77	19	4,73
	His	155,2	42	2,15	5	1,04	56	2,37	18	3,42	9	1,92
	Gly	75,1	233	5,76	42	4,23	310	6,35	50	4,59	76	7,84
non polaires	Ala	89,1	177	5,20	32	3,82	298	7,24	27	2,94	61	7,47
	Val	117,1	112	4,32	31	4,87	118	3,77	41	5,87	42	6,76
	Leu	131,2	172	7,43	52	9,16	224	8,01	56	8,99	43	7,35
	Ile	131,2	91	3,93	21	3,69	68	2,43	26	4,17	16	2,88
	Cys	121,2	32	1,28	6	0,97	27	0,89	9	1,33	5	0,83
	Met	149,2	25	1,23	10	2,00	30	1,22	18	3,29	9	1,85
	Pro	115,1	104	3,94	36	5,56	225	7,06	32	4,51	27	4,27
	Phe	165,2	110	5,99	36	7,98	150	6,76	35	7,07	20	4,54
	Trp	204,2	78	5,25	15	4,11	?	-	18	4,50	?	-

(*) Le nombre de résidus aminoacides a été déterminé pour la sous-unité monomérique dont la masse moléculaire est estimée à 70000 .

DISCUSSION

1. HETEROGENEITE DE LA BUTYRYLCHOLINESTERASE DU SERUM HUMAIN .

La BuChE nous est apparue constituée d'un système de formes multiples à quatre composantes, dont certaines sont parfois dédoublées et auxquelles viennent se surajouter, de façon inconstante, plusieurs autres espèces moléculaires.

La discussion de nos résultats et leur confrontation avec les données de la littérature implique la nécessité sémantique d'employer une terminologie constante, codifiée, et de fixer un cadre de référence. Le principal obstacle est celui du choix du système de nomenclature des formes de la BuChE.

Nous avons adopté la nomenclature de HARRIS et al. (1962) pour désigner les quatre formes principales du sérum C_1 , C_2 , C_3 et C_4 . Cette nomenclature n'est cependant pas reconnue de tous et certains auteurs se réfèrent à celle de LA MOTTA et al. (1965) Ch-1 à ChE-7; d'autres à celle de JUUL (1968) ChE₁ à ChE₁₂; d'autres enfin, SAED et al. (1972), emploient la nomenclature de LA MOTTA avec la typographie de JUUL; ainsi, au C_4 de HARRIS correspond le ChE-5 de LA MOTTA, vraisemblablement le ChE₇ de JUUL et le ChE₅ de SAED et al. Le risque de confusion est donc grand, surtout pour les formes moléculaires dont la présence dans le sérum n'est pas constante ou dépend des conditions de conservation. Ainsi, dans les sérums conservés au froid pendant plusieurs semaines, nous avons observé l'apparition de 3 nouvelles formes : une nouvelle forme de mobilité intermédiaire entre C_3 et C_4 que nous avons appelée

$C_{\text{pré } 4}$ et deux formes $C_{\text{post } 4}$. HARRIS et al. (1962) ne font pas mention de la forme de mobilité inférieure à C_4 , par contre, elle semble correspondre à la forme ChE-4 des préparations de LA MOTTA et al. (1965, 1968, 1970) et à celle "de mobilité intermédiaire entre la bande principale et les bandes rapides" que VINCENT et al. (1971) ont observé au cours d'essais de vieillissement. Les formes $C_{\text{post } 4}$ ont été nommées S_1 et S_2 par HARRIS et al. (1962), ChE-6 et ChE-7 par LA MOTTA et al. (1968). Elles correspondent peut-être aussi aux formes C_{7a} et C_{7b} de VAN ROS & DRUET (1966). Ces dernières, bien que portant la même numérotation, ne doivent pas être confondues avec les formes désialylées de OGITA (1975). (cf. p. 351).

2. LES FORMES PERMANENTES .

2.1. Nature de l'hétérogénéité moléculaire .

Le système de formes moléculaires multiples de la BuChE représente les différents niveaux de la structure quaternaire de l'enzyme : C_1 , C_3 , C_4 correspondent à la séquence d'oligomérisation : monomère - dimère - tétramère. Nous laissons de côté, pour le moment, la forme C_2 qui par son comportement marginal apparaît comme un dimère partiellement dégradé. Différents auteurs ont montré que les formes multiples de la BuChE diffèrent par leur taille, mais les résultats de LA MOTTA et al. (1968 et 1970) font apparaître que les masses moléculaires progressent régulièrement par adjonction alternée de fragments n et $2n$ (c.f. p 76). La signification de cette alternance n'est pas claire et les masses moléculaires que ces auteurs ont déterminées à partir des constantes de sédimentation, en appliquant la relation de MARTIN & AMES, sont probablement erronées, surtout celle de ChE-5 (C_4) pour les raisons que nous avons évoquées (c.f. p. 79). On sait depuis les travaux de filtration sur gel de BOUTIN & BRODEUR (1971) et d'hybridation de SCOTT & POWERS (1972) que la forme C_4 est un homotétramère constitué de 4 sous-unités C_1 . Les résultats que nous obtenons par des techniques différentes confirment ces données et apportent des éléments nouveaux concernant le processus d'association des sous-unités C_1 , la nature du terme moyen (la forme C_3) et l'organisation des sous-unités entre elles.

2.2. Approche de la géométrie moléculaire.

Sur la base des propriétés électrophorétiques et hydrodynamiques des formes C₁, C₃ et C₄, nous proposons le premier modèle moléculaire de l'enzyme. Il est encore grossier et rigide mais nous pensons pouvoir l'affiner. Un certain nombre de données sont en sa faveur.

- Celles relatives à l'importance de la copule glucidique (HAUPT et al. 1966) et des aminoacides hydrophiles (MUENSCH et al. 1976); ces résidus déterminent un pourcentage de polarité élevé qui selon la théorie de FISHER (1964) doit contribuer à l'étirement de la chaîne polypeptidique.

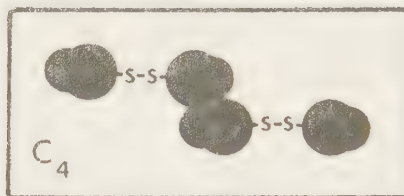
- Celles relatives à la stabilisation conformationnelle des sous-unités par ponts disulfures et à l'analogie des formes multiples de la BuChE avec les polymères de l'albumine bovine (SLAYTER, 1965; SCURZI & FISHBEIN, 1973) de structure linéaire. Nous disposons de peu d'éléments concernant la géométrie des cholinestérases, néanmoins, TENG et al. (1976) ont calculé le rapport de friction de la BuChE du sérum de cheval à partir de ses paramètres hydrodynamiques. La valeur qu'ils obtiennent : 1,50 correspond, dans l'hypothèse où le taux d'hydratation est pris égal à zéro, à celle d'un ellipsoïde allongé dont le rapport axial est de 9. Mais la détermination du paramètre β de SIMHA par la méthode de calcul de SCHERAGA & MANDELKERN (1953)

$$\beta = \frac{\mathcal{K}_S [\eta]^{1/3} \eta}{M^{2/3} (1 - \bar{v} \rho)} = (\rho_0 / 16200 \pi^2)^{1/3} \nu_*^{1/3} / f / f_0$$

fournit une valeur de $2,49 \cdot 10^6$ suggérant que le tétramère est un ellipsoïde beaucoup plus allongé et de rapport axial égal à 13.

D'autre part, TAYLOR et al. (1974) ont déterminé le rapport de friction de la forme 11S (tétramère) d'AChE de Torpedo marmorata. Ils obtiennent une valeur élevée : 1,65 et pensent que celle-ci est essentiellement due à la structure asymétrique de l'enzyme. En effet, bien que les cholinestérases soient des glycoproéteines dont la capacité de fixation de l'eau en surface, par liaisons hydrogène, est élevée, la contribution de l'hydratation au rapport de friction est modérée.

Selon notre modèle, la forme C_4 est constituée de deux dimères excentrés :



Nous pensons qu'il doit être possible de préciser les positions relatives des deux dimères et de déterminer, de manière indirecte mais précise, à quel type de symétrie correspond la forme tétramérique. En effet, depuis quelques années, se développe une technologie d'investigation de la structure quaternaire faisant appel, en particulier, à des diimidoesters bifonctionnels du type diméthylsubérimate (DAVIES & STARK, 1970; WOLD, 1972). Les travaux de HUCHO et al. (1975) et de HAJDU et al. (1976) ont permis d'étendre ces techniques à l'étude des arrangements des sous-unités et de la topographie des agrégats macromoléculaires. Plusieurs publications viennent d'apporter la démonstration de l'efficacité de cette méthodologie pour la détermination de la symétrie des protéines oligomériques (KOPPERSCHLÄGER et al., 1976 et HAJDU et al., 1977). Ces techniques appliquées à l'enzyme purifiée devraient apporter une réponse quant à la structure réelle de la forme C_4 .

2.3. Nombre de sites actifs .

Le nombre de sites actifs du tétramère, en particulier, demeure une des questions majeures de la biochimie de la BuChE à laquelle il ne nous a pas été possible d'apporter de réponse précise. Parmi les sept modèles possibles, nous en avons retenu deux, le II et le VI. Dans le premier, les formes C_1 , C_2 et C_3 ne possèdent qu'un site, le C_4 deux; dans le second, C_1 et C_2 ont un site, C_3 en a deux et le tétramère quatre. Le modèle II suppose qu'une sous-unité sur deux n'est pas fonctionnelle; dans le modèle VI, hormis le cas de la forme C_2 qui est un dimère incomplet, toutes les sous-unités sont actives.

Les données de la littérature relatives au nombre de sites sont peu nombreuses, contradictoires et ne se réfèrent qu'à la forme C_4 . Certaines sont en faveur du modèle II, d'autres en accord avec le modèle VI.

- Sur la base d'études cinétiques, KALOW (1964) a proposé un modèle à 2 sites (c.f. p 82). Les travaux de MUENSCH et al. (1976) semblent confirmer cette hypothèse : le titrage des sites au $[^{32}P]$ DFP indique un nombre de deux. Par marquage au DFP également, MAIN et al. (1972) obtiennent deux sites pour la BuChE du sérum de cheval. Les études cinétiques d'AUGUSTINSSON et al. (1974 et 1975) portant sur la même enzyme sont en accord avec ce résultat et présentent le tétramère comme un dimère fonctionnel dont les deux sous-unités catalytiques opèrent simultanément. Cependant, MAIN et al. (1974), procédant à une nouvelle détermination, affirment que le nombre de sites actifs doit être supérieur à 3 et peut-être égal à 4.

- Les récents travaux de LOCKRIDGE & LA DU (1978) donnent 4 sites actifs pour la forme C_4 de la BuChE du sérum humain.

Dans le domaine des AChE, la plupart des auteurs trouvent 4 sites actifs pour les formes 11S d'Electrophorus electricus (c.f. ROSENBERRY, 1975, p. 143; BON & MASSOULIE, 1976 a) mais certains ont obtenu des valeurs différentes : 2 (LEUZINGER, 1969), 3,3 (ROSENBERRY et al., 1972) et 2 (GORDON et al., 1976); il semble cependant que ces dernières soient incorrectes.

Malgré l'homogénéité des résultats de KALOW et de MUENSCH et al., la référence à une enzyme structuralement et catalytiquement peu différente, la BuChE du sérum de cheval, et à une autre qui présente également une certaine parenté avec elle, il reste encore une incertitude quant au nombre de sites actifs du tétramère de la BuChE du sérum humain. Examinons les deux hypothèses présentes :

- si le C_4 possède 4 sites, modèle VI, nous sommes dans le cas où tous les sites fonctionnent, donc tous les monomères sont

équivalents et l'interaction ne modifie pas les sites actifs.

- Si le C_4 possède 2 sites, modèle II, le problème est complexe mais peut être interprété de plusieurs manières : le tétramère apparaissant comme un dimère de dimères et chacun de ces éléments étant en position excentrée par rapport à l'autre, deux des centres actifs peuvent participer aux zones de contact ou être bloqués par des chaînons glucidiques formant écran. Cependant, après inhibition et traitement aux ultrasons, ils auraient dû être démasqués et se retrouver dans des formes présentant une activité. Le fait que cette expérience ait été négative suggère donc que le dimère n'a qu'un site fonctionnel sur deux. Ceci peut encore s'expliquer de deux façons au moins : ou bien les sous-unités C_1 qui constituent le dimère sont strictement identiques et leur dimérisation qui semble correspondre à un processus expansif, donc provoquant un remaniement structural important, entraîne le masquage ou la déformation d'un des deux sites; ou bien les sous-unités C_1 ne sont pas identiques. Cette dernière hypothèse n'a pas la solidité de la précédente et plusieurs de nos résultats la contredisent : les diagrammes d'HEDRICK & SMITH et de MANWELL indiquent que C_3 et C_4 ne sont constituées que d'un seul type de sous-unités : C_1 ; enfin, les expériences d'interconvertibilité montrent que la forme C_1 seule est capable d'engendrer la forme C_4 .

Nous nous proposons, malgré les difficultés que cela représente, mais compte tenu de notre expérience et des progrès accomplis ces dernières années dans le domaine de la purification des enzymes, de tenter d'obtenir une quantité pondérale de forme C_4 purifiée, de procéder au titrage de ses sites actifs et de vérifier si l'une des hypothèses formulées plus haut rend compte de leur nombre. Nous envisageons plusieurs plans expérimentaux. Celui qui nous paraît le plus simple et le plus apte à nous apporter les renseignements que nous cherchons consiste, dans un premier temps, à marquer le C_4 au $[^3\text{H}]$ DFP puis, dans un deuxième temps, à le dissocier sous l'action conjointe des ultrasons et d'un agent réducteur et enfin à procéder au marquage des formes C_1 obtenues à l'aide de $[^{32}\text{P}]$ DFP. Une incorporation

de ^{32}P signifierait que les sites actifs sont masqués. Un résultat négatif serait en faveur de l'hypothèse des sous-unités différentes.

3. LES FORMES INHABITUELLES .

3.1. Nature de $C_{\text{pré } 1}$

La nature et le mécanisme de formation de cette espèce observée de façon exceptionnelle dans le sérum reste pour nous encore obscure. Elle a rarement été décrite; seuls WEBER & TRELA (1976) en font mention et la présentent comme une espèce rare mais ils ne précisent pas dans quelles conditions elle apparaît. Après électrophorèse en présence de SDS, il nous est également arrivé de détecter dans les sérums anciens une forme de masse moléculaire 51800 ± 5300 . Il ne nous est pas possible de nous prononcer quant à l'identité de ces deux espèces qui apparaissent comme des sous-unités infra- C_1 . Il semble cependant qu'elles soient toutes deux des produits de dégradation mais elles n'apparaissent pas liées, ou du moins pas directement, aux formes C_2 et $C_{\text{pré } 4}$; en effet, la dissociation de celles-ci ne les produit pas. D'autre part, l'action de la trypsine sur le sérum ou sur chacune des formes ne les engendre pas.

A propos des AChE, l'existence d'espèces actives provenant du monomère est connue depuis quelques années.

- DUDAI & SILMAN (1974) ont constaté qu'après autolyse ou traitement à la trypsine, la masse moléculaire du monomère d'AChE d'Electrophorus electricus passe de 82000 ± 6000 à 59000 ± 4000 , tandis qu'un polypeptide inactif de masse 25000 est libéré. Selon ROSENBERY et al. (1974) pour lesquels le monomère a une masse de 70000, un clivage protéolytique ou glycolytique serait à l'origine de l'apparition de cette espèce active de masse 50000. Plus récemment, BON & MASSOULIE (1976 b) ont observé la formation d'un fragment de masse 60000 à partir de la sous-unité monomérique à laquelle ils assument une masse moléculaire

laire de 90000. Selon ces auteurs, ce fragment se formerait par réduction spontanée de ponts disulfures intracaténares.

STEELE & SMALMAN (1976) ont également mis en évidence, après électrophorèse de l'AChE de la tête de mouche domestique, en présence de SDS et de β -mercaptoéthanol, un fragment polypeptidique de masse 59000 qui, tout comme le monomère de 82000, fixe le DFP tritié.

- Enfin, ADAMSON (1977) vient de montrer l'existence d'une forme d'AChE inconstante de masse moléculaire de l'ordre de 52000 dans le cerveau, les érythrocytes et les muscles de la souris.

Il semble donc que l'existence de cette infra-sous-unité soit universelle, commune à toutes les cholinestérases. Cependant, les avis sont partagés quant à la nature des liaisons qui la relie au fragment glucidopeptidique et elle n'a pu, en raison de son inconstance, être étudiée de façon précise et systématique. Nous aurons cependant l'occasion d'en reparler dans le paragraphe consacré au rôle des ponts disulfures.

3.2. Nature de $C_{\text{pré } 4}$

La forme $C_{\text{pré } 4}$, pratiquement absente du sérum et du plasma frais, paraît être produite par l'action d'enzymes protéolytiques voisines de la trypsine sur la forme C_4 . Les résultats que nous obtenons après action de la trypsine sur le sérum ou sur les formes isolées confirment ceux de SAED et al. (1972): la trypsine provoque l'apparition de ChE_4 ($C_{\text{pré } 4}$) et l'intensification des formes ChE_3 (C_3) et ChE_1 (C_1). Lorsque l'incubation se prolonge, la protéolyse s'étend au-delà des sites de clivage spécifique et nous constatons, comme CHIU et al. (1972 b) sur la BuChE du sérum de cheval, une perte d'activité des formes légères, mais la forme C_4 est partiellement épargnée.

La forme $C_{\text{pré } 4}$ ne semble pas présente dans le plasma, in vivo (ou bien elle est à l'état de trace). Elle ne paraît

pas être un produit du catabolisme physiologique de l'enzyme mais plutôt un produit de dégradation consécutif à l'apparition dans le sérum de protéases qui peuvent être en relation avec les processus de coagulation et de fibrinolyse. La plasmine provoque d'ailleurs des effets analogues à la trypsine au bout d'un temps très long (SAED et al. 1971).

3.3. Nature des conformères .

L'existence de plusieurs points isoélectriques pour une même forme de BuChE, déjà constatée pour le C_4 par DAS & LIDDEL (1970), mais également pour l'AcHe érythrocytaire par BRODBECK et al. (1975), le dédoublement de certaines bandes, C_2 , C_3 et plus rarement C_1 , parfois observé mais que l'on remarque également sur les diagrammes publiés par JUUL (1968) et dont VINCENT et al. (1971) font mention, nous sont apparus être le reflet de la possibilité qu'ont ces formes, d'exister sous deux conformations stables. D'autre part, DAS et al. (1977) ont montré que l'AcHe érythrocytaire humaine peut subir des variations de conformation au cours de sa purification par chromatographie sur DEAE-Sephadex.

Nous nous sommes interrogé sur les divers mécanismes pouvant entraîner l'apparition de conformères. Ils sont essentiellement de deux types : post-transcriptionnels par modification épigénétique ou fonction des conditions du milieu. Dans le deuxième cas, les conformères sont le plus souvent des artefacts liés aux conditions de l'analyse (CANN & GOAD, 1968; DAS et al., 1977). A ce propos, CANN & STIMPSON (1977) viennent de montrer que les ampholines peuvent induire des isomérisations au cours de l'électrofocalisation. Mais on connaît des conformères dont l'existence, les propriétés et le rôle biologique sont conditionnés par des facteurs physicochimiques, la température par exemple (HENN & ACKERS, 1969; McCLARD & KOLENBRANDER, 1974; MOON, 1975). Nous avons examiné ces deux possibilités, mais seul le deuxième type de mécanisme a été exploré. Le dédoublement pouvait résulter d'interactions avec des molécules du tampon (CANN & GOAD, 1968) ou être lié à la structure de l'enzyme et ne s'exprimer que sous l'effet de la variation d'un des paramètres physicochimiques du milieu.

McCLARD & KOLENBRANDER (1974) ont en effet montré que les conformères de l'histidine ammonia-lyase sont température-dépendants et ils ont corrélié leur existence avec les discontinuités des diagrammes d'ARRHENIUS que l'on observe avec cette enzyme. Les récents travaux de BEAUREGARD & ROUFOGALIS (1977) démontrent la présence, à la surface de l'AChE érythrocytaire, d'un phospholipide, le cardiolipine, modulant l'activité de l'enzyme et responsable d'une cassure analogue dans les diagrammes d'ARRHENIUS. Or, le traitement du sérum par la phospholipase C de B.cereus entraîne des modifications de l'activité cholinestérasique, en particulier de C_1 , C_2 et C_3 , qui suggèrent qu'un phospholipide interagit avec chacune de ces formes et exerce, à l'état normal, des contraintes telles que le site actif se trouve bloqué dans une conformation défavorisant la catalyse. Par analogie avec les travaux de BEAUREGARD & ROUFOGALIS, et compte-tenu de la corrélation de McCLARD & KOLENBRANDER et des travaux de MOON (1975) sur l'adaptation thermique, nous avons pensé que les conformères pouvaient être température-dépendants et que les transconformations responsables de la modulation de l'activité enzymatique (elles-mêmes probablement dépendantes des variations de fluidité du phospholipide) pouvaient également affecter la charge, donc être responsables de l'existence des conformères. Aucune des deux hypothèses ne s'est vérifiée. En effet, pour un sérum donné présentant des conformères, les électrophorèses pratiquées dans différents tampons, en jouant sur le pH (dans les limites permises), la force ionique et la nature des ions, n'ont pour effet que de modifier les mobilités, mais les conformères persistent dans tous les cas. Les formes individualisées préparées à partir de ce sérum sont invariablement dédoublées, même après conservation à -20°C , pendant plusieurs semaines. Enfin, les variations des conditions du milieu n'induisent pas de conformères dans les sérums qui en sont exempts dans les conditions habituelles. L'électrophorèse pratiquée à différentes températures ($+8^{\circ}\text{C}$, $+12^{\circ}\text{C}$, $+20^{\circ}\text{C}$, $+30^{\circ}\text{C}$, $+37^{\circ}\text{C}$, $+40^{\circ}\text{C}$, $+42^{\circ}\text{C}$) ne provoque pas de modification au niveau des conformères : les bandes dédoublées persistent lorsqu'elles sont présentes et l'élévation de température n'en induit pas dans les sérums où elles sont initialement absentes. Par contre, l'activité des formes C_1 , C_3 et

et surtout de C_2 est fortement et irréversiblement déprimée à partir de 40°C.

La présence des conformères dans un sérum donné apparaît donc indépendante des conditions physicochimiques du milieu et de la durée de conservation de l'échantillon; en revanche, elle semble fonction de l'état physiologique du donneur. L'observation montre que, chez l'individu sain, ne prenant aucun médicament et dont l'alimentation est normale, des conformères peuvent apparaître transitoirement dans le sérum. Leur déterminisme nous échappe encore, mais l'hypothèse d'une modification épigénétique n'est pas à exclure. Celle-ci peut résulter de petites altérations survenant dans la circulation ou se produire à l'intérieur de la cellule hépatique au niveau de l'incorporation des sucres. JEANLOZ (1972) cite, en particulier, l'exemple de la microhétérogénéité des glycoprotéines due à des branchements isomériques d'acide N-acétylneuraminique, mais celle-ci peut aussi résulter de petites différences dans le nombre de résidus de NANA par molécule (BRODBECK et al., 1975).

4. NATURE DES LIAISONS ENTRE LES SOUS-UNITES .

4.1. Interactions faibles .

La relative insensibilité des formes multiples de la BuChE aux variations de la force ionique, du pH et de la constante diélectrique du milieu, nous ont conduit à penser que les interactions faibles, en particulier de COULOMB et de Van der WAALS ne sont pas les principales forces qui interviennent dans le processus d'association des sous-unités et de stabilisation des oligomères. Par ailleurs, la forme C_4 , tout comme les autres formes tétramériques des cholinestérases ne présente pas, à l'état natif, de tendance à la dissociation ou à la formation d'agrégats lorsque la force ionique du milieu varie. Les études portant sur les AChE d'Electrophorus electricus et de Torpedo marmorata montrent que les formes tétramériques 11S sont insen-

sibles aux variations de la force ionique (DUDAI et al., 1972; DUDAI & SILMAN, 1974b) alors que les formes 14S et 18S sont connues depuis longtemps pour engendrer de gros agrégats à faible force ionique (GRAFIUS & MILLAR, 1965; CHANGEUX, 1966). Il n'est pas dans nos intentions de nous étendre sur cette particularité en contradiction avec la théorie de DEBYE-HÜCKEL et qui est encore l'objet d'interrogations. Enfin, les travaux de LEE & HARPTS (1973) sur la BuChE du sérum de cheval montrent également l'insensibilité du tétramère vis-à-vis des variations de la force ionique. Ces données sont intéressantes et démontrent que la participation des liaisons hydrogène à l'association des sous-unités est, sinon nulle, du moins très faible. En effet, les sels chaotropiques, le NaCl en particulier, provoquent d'une façon générale la dissociation des oligomères dont les sous-unités sont liées par ce type de liaison (SAWYER & PUCKRIDGE, 1973); leurs effets sur les liaisons hydrophobes sont plus difficiles à quantifier (PRAKASH & NANDI, 1977), mais dans le cas présent, les pourcentages de polarité des aminoacides et l'importance de la copule glucidique excluent pratiquement la possibilité d'oligomérisation par interactions hydrophobes.

Cependant, l'action du β -mercaptoéthanol et des ultrasons sur la forme C₄ montre que les liaisons interdimériques sont labiles et ne semblent pas mettre en jeu de ponts disulfures. L'interface des deux dimères doit donc être relativement complexe et l'association doit être la résultante d'un ensemble d'interactions faibles essentiellement électrostatiques et dipolaires. Le pontage de certains groupements carboxyliques entre eux par l'intermédiaire de cations divalents, peut être également envisagé. Nous pensons particulièrement aux groupements carboxyliques des résidus d'acide N-acétylneuraminique.

4.2. Ponts disulfures .

Les ponts disulfures inter-monomériques nous apparaissent être les facteurs essentiels de la formation et de la stabilisation des formes moléculaires multiples de la BuChE. La di-

mérisation est principalement due à l'oxydation de groupements thiols libres du monomère, comme cela se produit pour la polymérisation de l'albumine, de l'uréase (FISHBEIN et al., 1972 et 1973) et de la catalase érythrocytaire porcine (TAKEDA & SAMEJIMA, 1977), et l'organisation du tétramère sous forme de dimère de dimères apparaît résulter de la conjonction des interactions faibles que nous venons d'évoquer.

Ce type de structure quaternaire semble être fréquent pour les protéines tétramériques. Citons à titre d'exemples la neuraminidase du virus grippal A₂/1957 (KENDAL & ECKERT, 1972), la dopamine β -hydroxylase (CRAINE et al., 1973), l'hormone de croissance humaine (LEWIS et al., 1977). L'AChE 11S de l'organe électrique d'*Electrophorus electricus* a également une structure de ce type. En 1974, ROSENBERRY et al. ont montré qu'elle est un dimère de dimères $[(\alpha)_2]_2$ dans lequel α représente la sous-unité catalytique. La même année, DUDAI & SILMAN (1974a), sur la base des données de l'électrophorèse en présence de SDS et de traitements tryptiques de l'enzyme, ont proposé les premiers modèles structuraux d'AChE.

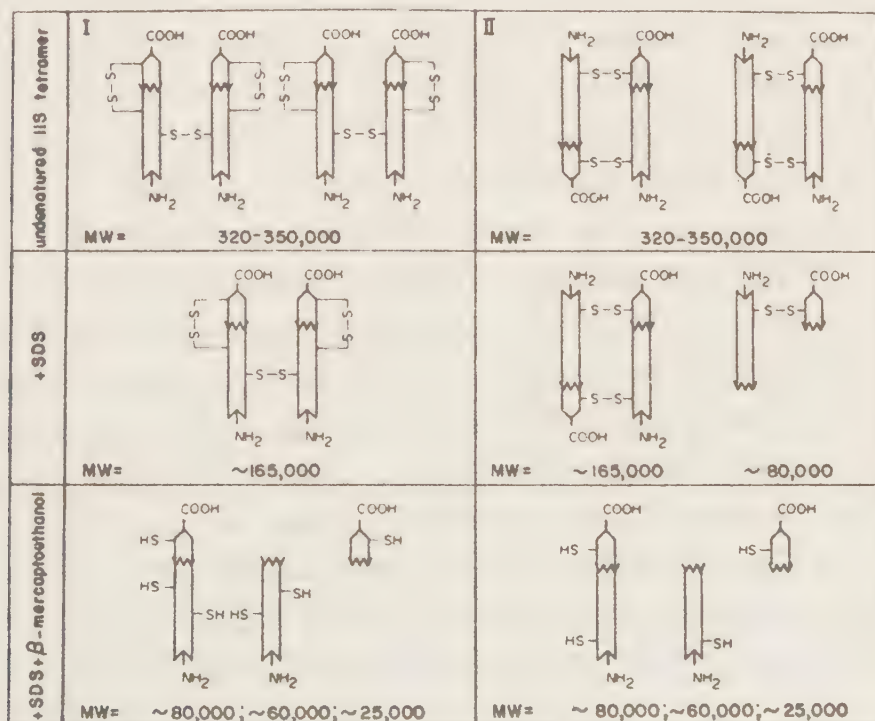


Fig. 1 : Modèles de DUDAI & SILMAN (1974a) pour l'AChE 11S.

Les récents travaux de ROSENBERRY & RICHARDSON (1977) et de McCANN & ROSENBERRY (1977) relatifs à l'organisation en grappe des formes 14 et 18 S de cette enzyme confirment l'arrangement des tétramères 11S qui les constituent en dimères de dimères reliés par ponts disulfures à une "queue" de structure analogue à la triple hélice du collagène.

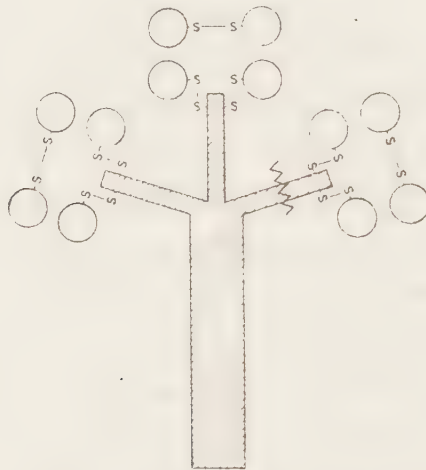


Fig. 2 : Structure de la forme 18S d'AcHé d'après ROSENBERRY (1977)

Selon MUENSCH et al. (1976) la forme C_4 de la BuChE du sérum humain renferme 32 cystéines. Si toutes sont engagées dans des liaisons disulfures, cela implique l'existence de 16 ponts disulfures par tétramère, soit 8 par dimère. Il semble peu probable, pour des raisons d'encombrement stérique, que tous soient impliqués dans les liaisons intermonomériques; une partie de ceux-ci doit être intracaténaire et doit participer à la stabilisation de la structure tertiaire de chaque monomère. (TENG et al. (1976) pensent que le monomère de la BuChE du sérum de cheval possède 3 ponts disulfures internes). Le monomère ayant une masse moléculaire de l'ordre de 80000, on peut se poser la question de savoir s'il est constitué d'une seule chaîne polypeptidique ou de plusieurs reliées entre elles par ponts disulfures. Nous ne pouvons apporter de réponse définitive à cette interrogation. La présence d'une sous-unité infra- C_1 après dénaturation par le SDS et le β -mercaptoéthanol évoque l'existence de deux chaînes. Cependant, son inconstance tend à nous faire rejeter cette hypothèse. Nous

sommes plutôt enclin à penser, comme la plupart des auteurs qui étudient la structure de l'ACHé, que ce fragment provient d'un clivage protéolytique du monomère. Des ponts disulfures intracaténaux situés dans une zone interne de la protéine empêchent sa libération; celle-ci ne se produirait qu'en présence d'agents réducteurs et dénaturants. Les modèles I et II de DUDAI & SILMAN (1974a) qui illustrent un tel processus sont peut-être applicables à notre enzyme. Des études plus poussées devraient permettre de trancher sur ce point.

4.3. Interconvertibilité des formes .

Nous avons cru à tort que le système des formes multiples de la BuChE contenait en lui la potentialité de subir des transitions association $\rightleftharpoons$ dissociation si l'on faisait varier les conditions du milieu; nous avons montré que le système est, en fait, relativement rigide. Cette rigidité est imposée en partie par la présence des ponts disulfures intercaténaux. Cependant, le potentiel d'oxydo-réduction du système cystine/cystéine égal à - 0,15 volts à pH 7 (YON, 1969, p. 111) (toutefois susceptible de variations selon l'environnement) et l'accessibilité des ponts disulfures de C₃ et surtout de C₂ laissent aux formes de la BuChE la possibilité de s'interconvertir spontanément dans le sérum. En effet, le potentiel red-ox du sang mesuré avec une électrode au calomel est compris entre - 0,26 et - 0,30 V (DOCUMENTA GEIGY, 1972, p. 571). Ce phénomène que nous observons est également décrit par plusieurs auteurs. Les courbes cinétiques de MAIN (1969) suggèrent que les formes multiples de la BuChE du sérum de cheval sont interconvertibles et, à propos de l'ACHé d'Electrophorus electricus, BON & MASSOULIE (1976b) font remarquer que la sous-unité α (monomère actif : BON & MASSOULIE, 1976a) peut provenir de la réduction spontanée des ponts disulfures du dimère α_2 . Enfin, la découverte récente par MAIN et al. (1977) d'une Butyrylcholinestérase de masse moléculaire 83000 présente à forte concentration dans un pool de sérums de lapin suscite un vif intérêt chez ces auteurs qui s'interrogent, en particulier, sur sa relation avec les formes oligoméri-

ques. Cependant, MAIN et ses collaborateurs n'évoquent pas la possibilité de liaisons par ponts disulfures.

L'interconvertibilité semble donc en partie conditionnée par des phénomènes d'oxydoréduction siégeant au niveau des zones de contact intermonomériques et concernant le système thiol/disulfure.

5. ROLE DE LA PARTIE GLUCIDIQUE ET EN PARTICULIER DE L'ACIDE N-ACÉTYLNEURAMINIQUE .

5.1. La partie glucidique .

Selon l'hypothèse d'EYLAR (1965), la partie glucidique des glycoprotéines et, dans le cas présent, d'une glycoprotéine de sécrétion, aurait pour rôle de permettre aux protéines de passer au travers de la membrane lors de leur transfert des lieux de biosynthèse vers l'espace extracellulaire. Si cette hypothèse est confirmée par un certain nombre de résultats (HEIDE & SCHWICK, 1973), il n'en demeure pas moins que la principale protéine de sécrétion du foie et qui constitue plus de 50 % des protéines plasmatiques, l'albumine, est totalement dépourvue de sucres (JUDAH & QUINN, 1976).

Dans le cas particulier de la BuChE du sérum humain, le rôle de la partie glucidique reste totalement inconnu, mais il est vraisemblable que cette copule contribue à stabiliser la conformation de la chaîne polypeptidique. En admettant que l'enzyme ait une fonction physiologique, certains déterminants glucidiques peuvent également constituer des structures de reconnaissance pour des récepteurs membranaires ou pour toute autre molécule.

5.2. L'acide N-acétylneuraminique .

Si le rôle global de la copule glucidique n'apparaît pas clairement, celui de l'acide N-acétylneuraminique, situé à

sa périphérie, se distingue au niveau structural et probablement aussi au niveau métabolique.

Hormis le cas de la forme C_2 qui présente, en particulier, un déficit en NANA à l'origine de ses propriétés électriques différentes de celles des autres formes, le monomère, le dimère et le tétramère renferment la même quantité de cet acide par unité de masse. Selon HAUPT et al. (1966), le NANA représente 6 % de la masse de la protéine et 25 % de la fraction glucidique.

Avec un pK_a de 2,6, tous les résidus de NANA sont ionisés au pH physiologique, et la détermination du point isoélectrique avant et après traitement par la neuraminidase nous ont montré qu'ils sont essentiellement responsables de l'acidité des formes C_1 , C_3 et C_4 . Ces nombreux résidus couvrant une surface relativement étendue, la densité des charges négatives est élevée et il se crée un champ électrique répulsif qui a tendance à allonger les enzymes. L'élimination de l'acide N-acétylneuraminique, en perturbant la structure tridimensionnelle de chaque forme, provoque leur agrégation "aveugle".

Cependant, si la présence des résidus de NANA est en partie responsable de la géométrie et de l'existence des différentes formes de la BuChE, ces résidus n'interviennent pas sur l'activité de l'enzyme. AUGUSTINSSON & EKEDahl (1962b) avaient déjà montré qu'après traitement à la neuraminidase, l'activité de la BuChE du sérum humain ne variait pas; les mesures que nous avons effectuées au pH-stat confirment ce fait. Donc, en admettant que les résidus de NANA couvrent une large surface de chaque enzyme, les régions voisines du centre actif doivent être dégagées : l'élimination du NANA ne perturbe pas la structure locale. De la même manière, BRODBECK et al. (1973) ont montré que les propriétés catalytiques de la BuChE des muscles de Pleuronectes platessa ne sont pas modifiées par l'élimination de l'acide N-acétylneuraminique et qu'il existe certaines glycoprotéines, la thrombine, la glycoamylase et la chloroperoxydase en particulier, dont les propriétés ne sont pas affectées par l'élimination de leurs sucres. HEIDE & SCHWICK (1973) citent

également une quinzaine de sialoprotéines du sérum humain dont l'activité n'est pas perturbée par la perte du NANA. Il ne semble pas qu'il faille cependant généraliser car on connaît un grand nombre de glycoprotéines, surtout des hormones, dont l'élimination d'un seul sucre ou d'un résidu NANA est suffisant pour modifier leurs propriétés physiologiques. Certes, il s'agit dans la plupart des cas, plus de la perte d'une structure de reconnaissance que d'une modification conformationnelle (HEIDE & SCHWICK, 1973; LLOYD, 1975) mais, au sein même des cholinestérases, d'importantes variations des paramètres catalytiques ont été mises en évidence après action de la neuraminidase. Ainsi, l'élimination de l'acide N-acétylneuraminique des AChE et BuChE provenant de cultures de neuroblastes de souris ou d'astroblastes de hamster entraîne une augmentation de 500 % de l'activité de la BuChE qui semble liée à une transconformation (STEFANOVIC et al., 1975).

5.3. Hypothèse sur la nature de la forme C₂.

Nous avons maintes fois souligné le caractère marginal de la forme C₂ et montré que ses propriétés particulières étaient en partie liées à un déficit en NANA. Il ne nous a pas encore été possible de démontrer l'origine de cette forme, mais nos recherches actuelles sont orientées dans cette direction. Les données font défaut en ce qui concerne les différentes étapes de l'incorporation des sucres à la chaîne polypeptidique au cours de la biosynthèse de l'enzyme dans l'hépatocyte, mais l'existence dans la cellule de formes enzymatiques déficitaires en acide N-acétylneuraminique peut être un argument en faveur de l'hypothèse d'une synthèse compartimentale analogue à celle des immunoglobulines, dans laquelle l'incorporation du NANA au niveau de l'appareil de GOLGI en serait le stade ultime. Dans cette hypothèse la forme C₂ peut être considérée comme un précurseur, une forme immature sécrétée en même temps que les autres. Il faut être prudent, et SVENSMARK (1963) ne donne aucun renseignement sur la masse moléculaire des formes hépatiques déficitaires en NANA. Pour étayer cette nouvelle hypothèse, il serait nécessaire d'établir une analogie structurale entre C₂ et les deux formes hépatiques. Ce-

pendant, on est en droit de s'interroger sur la relative complexité de C_2 . Un précurseur peut-il être de structure dimérique et asymétrique? Il semble plus logique de penser que si un précurseur devait être présent dans le sérum, il le serait sous forme monomérique plutôt que dimérique. Il est donc peu probable que C_2 soit une forme immature; au contraire, tout nous porte à croire non par intuition mais de façon discursive, que cette forme résulte d'une modification épigénétique et qu'elle représente une forme dégradée du dimère. En effet, bien que C_2 ne fasse pas partie de la famille des isomères de taille C_1 , C_3 , C_4 , par dissociation elle engendre C_1 ainsi qu'une sous-unité muette. C'est donc sur cette seconde sous-unité que porte la modification. Celle-ci ne se limite pas à la désialylation, car la différence de masse, de l'ordre de 20000, que l'on observe entre C_3 et C_2 est trop importante et la seule désialylation serait sans effet sur son activité. Il y a donc élimination d'un fragment glucopéptidique.

On doit s'interroger sur le mécanisme et la signification biologique d'un tel processus.

On peut considérer deux possibilités de dégradation :

- dans la cellule hépatique au cours de la phase de stockage, c'est-à-dire entre la phase finale de la biosynthèse dans l'appareil de GOLGI et le moment de la sécrétion;

- dans la circulation après sécrétion.

Les exemples connus de glycoprotéines désialylées dans l'hépatocyte se réfèrent aux enzymes lysosomales ou incluses dans des peroxysomes (cas de la catalase du foie de souris, JONES & MASTERS, 1975). Si les lysosomes dont le rôle est précisément de dégrader renferment des neuraminidases, il est par contre exclu que les vésicules golgiennes assurant le transport puis la sécrétion par exocytose des glycoprotéines sialylées, contiennent de telles enzymes. La seconde voie de dégradation nous semble donc plus probable. MORELL et al. (1971) ont montré que la présence de l'acide N-acétylneuraminique joue un rôle déterminant dans la

survie des glycoprotéines sériques : à l'exception de la transferrine, les protéines désialylées sont rapidement éliminées de la circulation, captées par les cellules de KUPFFER et les hépatocytes, puis dégradées dans leurs lysosomes (ASHWELL & MORELL, 1970). Selon ASHWELL & MORELL (1974), c'est le galactose, sucre adjacent au NANA qui, devenant terminal après la désialylation, constitue le déterminant de la reconnaissance hépatique. Ce schéma, du moins en ce qui concerne la phase finale, risque d'être reconsideré en partie. En effet, THOMAS & SUMMERS (1978) viennent de montrer que plusieurs glycoprotéines préalablement désialylées et injectées au rat, ne subissent pas de dégradation hépatique, mais sont excrétées par la bile, apparemment non modifiées. La présence d'une activité cholinestérasique dans la bile pourrait signifier que l'enzyme emprunte cette voie métabolique.

On peut donc avancer l'hypothèse que C_2 est une forme dégradée de C_3 , constituant la première phase du catabolisme de l'enzyme. Cette hypothèse suppose l'existence dans le sérum d'au moins deux enzymes : une neuraminidase et une protéase agissant conjointement ou consécutivement. L'existence de protéases plus ou moins complexées à d'autres protéines sériques est une réalité connue depuis longtemps et nous avons montré que la forme $C_{pré\ 4}$ est produite, notamment, sous l'action de la trypsine. Par contre, l'existence d'une neuraminidase sérique n'est pas encore parfaitement établie. Seuls, WARREN & SPEARING (1960) ont trouvé une activité neuraminidasique dans des préparations commerciales de glycoprotéines sériques. Il est possible qu'une faible activité neuraminidasique, d'origine tissulaire, se manifeste à l'état normal dans le sérum, d'autant que cette enzyme a été mise en évidence dans plusieurs organes (GIELEN, 1974). De même, GIELEN (1974) ainsi que CARUBELLI & YEH (1974) ont démontré la présence d'une neuraminidase très active dans les membranes des leucocytes. Enfin, plusieurs travaux relatifs à la BuChE apportent un soutien à notre hypothèse. SVENSMARK (1961) a observé une diminution de la mobilité électrophorétique de la BuChE du sérum chez des malades atteints d'affections neurologiques et montré qu'elle est la conséquence d'une désialylation due à la présence d'une neuraminidase dans le sérum.

de ces malades. Les travaux d'OGITA (1975) apportent des arguments supplémentaires en faveur de notre thèse. Le point de départ de ses recherches fut l'observation, chez un patient de 67 ans atteint d'un léiomyome péritonéal, d'une très faible activité cholinestérase sérique à la suite d'une apnée prolongée post opératoire. OGITA faisant incuber un sérum normal ou la forme C_4 purifiée avec le sérum de ce malade, constate une diminution de l'activité cholinestérasique, associée à l'apparition de nouvelles formes moléculaires de mobilités plus faibles que C_4 et qu'il nomme C_6 , C_{7a} , C_{7b} , C_{8a} , C_{8b} , C_9 et C_{10} . Le sérum de ce malade contient donc un facteur de modification. L'auteur postule l'existence de 2 facteurs : un facteur X responsable de la transformation de C_4 en plusieurs formes, et un facteur Y qui provoque une diminution d'activité. OGITA démontre que le facteur X est une neuraminidase et, par analogie avec l'action des protéases sur C_4 suppose que le facteur Y est une enzyme protéolytique du type trypsine ou plasmine. L'hypothèse épigénétique est donc admissible. Il existe un locus génétique N (neuraminidase) qui fonctionne modérément dans les conditions physiologiques (activité neuraminidasique tissulaire et leucocytaire) mais qui peut s'exprimer de façon intense dans certaines circonstances pathologiques, telles que des processus de tumorigénèse.

Notre thèse est la suivante : associée à une ou plusieurs protéases, la neuraminidase déclenche le processus du catabolisme de la BuChE. Dans les conditions physiologiques normales, lorsque son activité est faible, ce processus est modéré et seul C_2 est produit. Dans les conditions pathologiques évoquées plus haut, où son activité est intense, la dégradation entraîne la formation de gros agrégats de mobilité inférieure à C_4 (C_6 à C_{10}). Nous avons d'ailleurs observé ces formes en traitant le sérum ou les différentes formes de la BuChE par la NANase de Clostridium perfringens.

5.4. Origine de la forme C_2

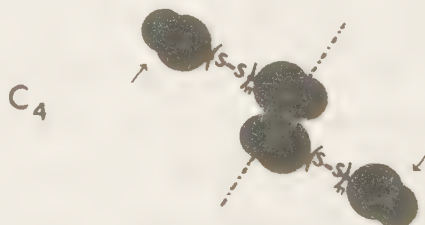
Il y a un point troublant sur lequel il nous faut réfléchir, c'est celui de la dissymétrie de la forme C_2 .



Comment peut-on expliquer, avec l'hypothèse de la modification épigénétique que C_2 , dimère diminué, conserve encore une sous-unité C_1 intacte ? En effet, si l'on admet que C_2 est un produit de dégradation de C_3 , l'attaque des hydrolases doit théoriquement se faire dans toutes les directions et porter simultanément sur les 2 sous-unités de C_3 . Or, il n'en est rien.



Reprenons l'ensemble de nos résultats. La BuChE du sérum humain est constituée d'un système de formes multiples représenté par une famille de polymères : monomère, dimère et tétramère, et d'une forme C_2 proche du dimère. La forme tétramérique C_4 possède toutes les caractéristiques d'une protéine allongée et apparaît être constituée de deux dimères accolés, légèrement excentrés.



Il est donc possible que l'association des deux dimères dans la forme C_4 masque partiellement deux sous-unités C_1 et que seules les sous-unités C_1 externes soient exposées. Dans cette hypothèse, l'attaque de la neuraminidase et des protéases porterait sur ces deux sous-unités. L'élimination du fragment glucidopeptidique déstabilisant l'édifice provoquerait sa dissociation et la formation de 2 C_2 . Ainsi, C_2 ne proviendrait pas de C_3 mais de C_4 . Cette conception sur l'origine de C_2 semble

cohérente et reste la seule à expliquer sa structure dissymétrique. Il convient donc de modifier le schéma relationnel de la façon suivante :

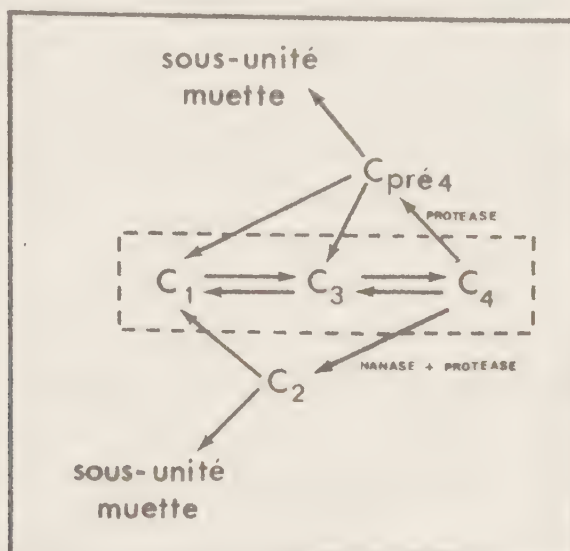


Fig. 3 : Relations entre les formes multiples de la BuChE.

Nous ne disposons actuellement d'aucune méthodologie pour vérifier cette hypothèse chez l'homme; néanmoins, nous entrevoyons plusieurs voies d'approche qui devraient nous permettre d'étudier le catabolisme de la BuChE et la genèse de la forme C_2 .

- Chez l'homme : l'étude comparative des propriétés moléculaires des formes de la butyrylcholinestérase du tissu hépatique prélevé par biopsie, de la bile et du sérum devrait permettre d'apporter confirmation à notre hypothèse (ou de la rejeter) et d'orienter nos recherches. Enfin, l'examen des formes multiples dans divers syndromes d'insuffisance hépatique devrait, théoriquement, faire apparaître une augmentation relative de la forme C_2 .

- Chez l'animal de laboratoire, le chat ou le cobaye, dont la cholinestérase sérique d'origine hépatique présente une spécificité assez proche de celle de l'homme, nous envisageons d'étudier les formes multiples de l'enzyme, de rechercher parmi celles-ci la présence d'une forme analogue à C_2 , de mesurer leur renouvellement et de suivre par marquage les étapes de leur catabolisme.

- Si nous parvenons à purifier les différentes formes de l'enzyme comme cela paraît maintenant réalisable par la méthode de LOCKRIDGE & LA DU (1978), il sera possible de vérifier si l'hypothèse de THOMAS & SUMMERS (1978) est valable pour notre enzyme en étudiant chez le rat, après injection de la forme C_4 préalablement désialylée et marquée et de la forme C_2 marquée, la transformation éventuelle de C_4 en C_2 sous l'action d'hydrolases sériques.

6. INTERACTION AVEC D'AUTRES MOLECULES .

6.1. Interaction de la BuChE avec des phospholipides.

La valeur élevée du volume spécifique partiel ($0,78 \text{ ml.g}^{-1}$) obtenue par LEE & HARPST (1973) pour la BuChE du sérum de cheval a pu faire croire que cette enzyme était une glycolipoprotéine à forte teneur en lipides. Cependant, le réexamen de ce résultat par la même équipe (TENG et al. 1976) en le ramenant à une valeur très voisine de celle que nous trouvons pour l'enzyme humaine ($0,723 \text{ ml.g}^{-1}$) permet d'écarter définitivement cette hypothèse. Les auteurs ne nient pas que la BuChE du sérum de cheval soit associée à des molécules lipidiques, mais celles-ci doivent être en faible quantité.

Les acétylcholinestérases, par contre, nous offrent l'exemple de glycoprotéines associées à un grand nombre de molécules lipidiques. En 1968, BURGER et al. ont, les premiers, montré que l'AChE des érythrocytes de boeuf a une densité caractéristique des lipoprotéines. Dans leur récente publication, BEAUREGARD & ROUFOGALIS (1977) montrent que le dimère de cette enzyme est fortement associée, par interactions ioniques, à une trentaine de molécules de cardiolipine. De la même façon, NIDAY et al. (1977) viennent également de mettre en évidence, dans une préparation purifiée d'AChE d'érythrocytes humains, la présence de phospholipides fortement liés à l'enzyme. Ces phospholipides, 2 à 5 % de la masse de l'enzyme, sont principalement représentés

par la phosphatidylsérine. Selon BEAUREGARD & ROUFOGALIS, les changements d'état des phospholipides induisent des variations de la conformation de centre actif responsable de la dépendance de l'activité de l'enzyme sur la température. Ce phénomène soupçonné par PLUMMER et al. (1975) pour l'AChE du cerveau de porc et par MARTINEZ DE MELIAN et al. (1976) pour l'AChE des érythrocytes de rat, est peut-être à rapprocher de l'augmentation de l'activité de l'AChE d'Electrophorus electricus que RIEGER et al. (1973) ont observée après traitement de l'enzyme par la phospholipase C de B.cereus et que nous avons également mise en évidence avec la BuChE du sérum humain.

Récemment, enfin, PETER & HEGER (1977) ont démontré que le phosphatidylinositol est un constituant essentiel de l'acétyl CoA carboxylase du foie de rat. L'interaction de l'enzyme avec des molécules de ce phospholipide permet son passage d'une forme monomérique inactive à des formes polymériques seules actives in vivo. Environ 130 molécules de phosphatidylinositol seraient nécessaires pour que l'enzyme fonctionne avec une activité maximum.

Les résultats que nous obtenons, par des méthodes indirectes certes, font apparaître qu'il existe à la surface de l'enzyme des phospholipides sensibles à la phospholipase C, susceptibles de jouer un rôle analogue à celui du NANA dans la stabilisation des structures tertiaire et quaternaire, mais aussi un rôle modulateur de l'activité. Leur élimination (hydrolytique) a pour effet d'augmenter l'activité totale de l'enzyme de 11 %. Il est significatif de rappeler que nous obtenons les mêmes effets que RIEGER et al. avec des phospholipases C provenant des mêmes espèces bactériennes. Il est d'autre part troublant de constater que ce sont les formes C₁, C₂ et C₃ qui sont les plus sensibles à l'activation.

Il sera intéressant de déterminer les paramètres catalytiques de ces formes après traitement à la phospholipase C de B. cereus et de les comparer aux valeurs que l'on obtient à l'état natif. On devrait pouvoir expliquer pourquoi ces formes mo-

léculeaires, catalytiquement défavorisées par rapport à C_4 , se trouvent subitement activées. Nous formulons l'hypothèse que ces formes interagissent avec des phospholipides et que ceux-ci exercent des tensions telles que la conformation du centre actif est modifiée et diminue l'affinité de l'enzyme pour le substrat. L'hydrolyse des phospholipides, en restaurant la conformation du centre actif, permet à l'enzyme de fonctionner normalement. Cette hypothèse est cependant fragile car elle implique que si la forme tétramérique a le plus d'affinité pour le substrat, c'est parce qu'elle n'est pas associée à des phospholipides. Bien que BEAUREGARD & ROUFOGALIS (1977) affirment que les molécules de cardiolipine sont associées avec le dimère de l'AChE, et malgré les analogies qui existent entre cette enzyme et la BuChE, on ne doit pas exclure, a priori, l'existence d'une interaction tétramère-phospholipides, mais on peut penser que les deux dimères en s'associant modifient à la fois la conformation des centres actifs du tétramère et la position des éventuelles molécules lipidiques; celles-ci pourraient alors être masquées des phospholipases ou adopter une conformation ne permettant pas leur attaque. Cette hypothèse, pour le cas où BuChE et AChE auraient des structures analogues, pourrait expliquer pourquoi les phospholipases A_2 et C se montrent inactives sur l'AChE érythrocytaire (BEAUREGARD & ROUFOGALIS, 1977) bien que l'enzyme soit riche en phospholipides. Cette hypothèse, encore, permet d'expliquer l'apparente contradiction de nos résultats avec ceux de KUTTY et al. (1973) à propos de l'action de la phospholipase D. Ces auteurs traitant une préparation de β -lipoprotéines du sérum humain par la phospholipase D constatent une libération de BuChE et la transformation de la β -lipoprotéine en une lipoprotéine de mobilité électrophorétique de type pré- β . D'autre part, les inhibiteurs des cholinestérases tels que l'ésérine peuvent déstabiliser les β -lipoprotéines. Ces résultats leur suggèrent que la BuChE participe à la stabilisation des β -lipoprotéines. Ils émettent alors l'hypothèse que l'interaction β -lipoprotéine-BuChE s'effectue par l'intermédiaire d'une phosphorylcholine dont l'ammonium quaternaire est fixé au niveau du site anionique du centre actif de l'enzyme.

Si la liaison entre la BuChE et une β -lipoprotéine semble évidente, les derniers travaux de KUTTY et al. (1977) le démon-

trent (voir page 27), il semble que la quantité de BuChE fixée sur cette protéine soit très faible et comparable à celle qui est liée à l' α_2 -macroglobuline. Plusieurs arguments expérimentaux relatifs à des travaux en cours nous permettent d'avancer cette thèse.

- L'électrophorèse annulaire (T = 8 %) du sérum, avec révélation en parallèle des lipoprotéines au Noir Soudan (SEBIA) et de la BuChE par la méthode de JUUL, ne montre pas de chevauchement des bandes correspondant d'une part aux fractions lipoprotéiques HDL, LDH, VLDL et chylomicrons et, d'autre part, aux formes C₁, C₂, C₃ et C₄.

- La même observation est faite après électrophorèse sur "lipofilm" SEBIA en tampon TRIS/glycocolle, pH 9, $\mu = 0,025$ où la BuChE se résout en deux fractions : l'une intense, l'autre faible, de mobilités intermédiaires entre les HDL et les LDL.

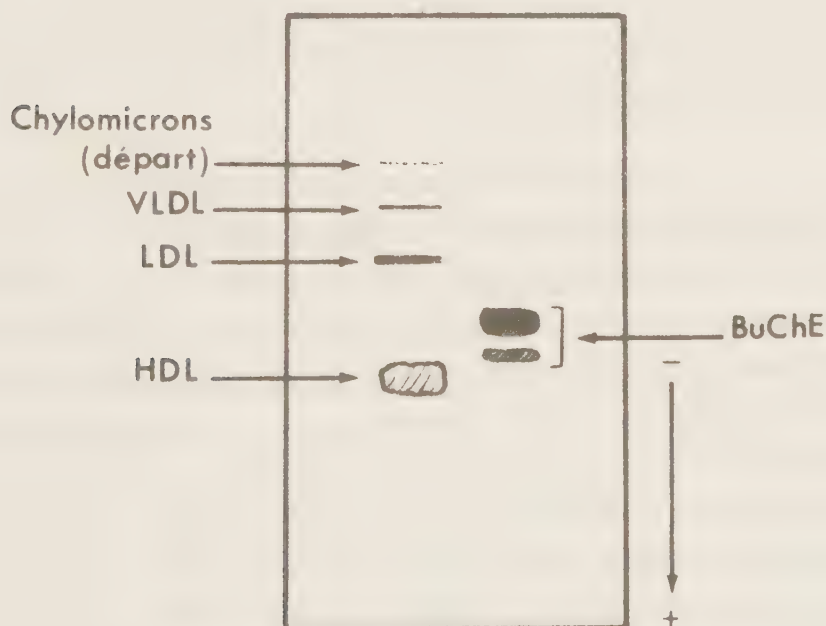


Fig. 4 : Electrophorèse sur "lipofilm" SEBIA .

- Bien que DUBBS (1966) ait envisagé la possibilité pour les β -lipoprotéines de séquestrer la cholinestérase sous une forme active et de la libérer sous l'action des ultrasons, la sonication

du sérum, dans les conditions décrites, suivie d'électrophorèses sur "lipofilms", ne nous a pas montré de modifications significatives de la mobilité et de la répartition des différents groupes de lipoprotéines. On peut toutefois objecter que les ultrasons, en rompant les liaisons hydrophobes qui unissent lipides et apoprotéines, ont entraîné la dissociation des lipoprotéines, et qu'entre cette opération et l'électrophorèse, elles ont pu se reconstituer. Cependant, leur action au niveau des quatre formes de la BuChE se montre apparemment irréversible : la diminution de l'activité est progressive et, au niveau de la répartition des formes, après une première phase essentiellement marquée par la désagrégation de C_4 en C_3 et C_1 , il se produit une augmentation de C_3 qui semble principalement due à l'oxydation des groupements thiols de C_1 , donc à la dimérisation de cette forme. Ce mécanisme que nous proposons a été également envisagé par HESS et al. (1964) pour expliquer la dimérisation de l'albumine bovine sous l'action des ondes ultrasonores. L'hypothèse de la séquestration sélective d'une des formes de la BuChE et de sa libération sous l'action des ultrasons apparaît donc fragile. Nous ne la rejetons pas, mais affirmons qu'elle ne peut, en aucun cas, exprimer la totalité du phénomène car :

- L'électrophorèse bidimensionnelle (première dimension $T = 8\%$, deuxième dimension plaque GRADIPORE $T \in 3,3 - 28\%$) révèle la présence parmi les formes lourdes post- C_4 d'espèces peu actives qui pourraient correspondre à des protéines résultant de l'interaction d'une forme de la BuChE avec des β -lipoprotéines. Nous n'avons pu estimer la masse moléculaire de ces espèces, cependant, on sait que les LDL ont des masses moléculaires comprises entre 400000 et 500000 et un diamètre moyen de 200 à 300 Å (VAITON & BACQUES, 1976); ces formes actives seraient donc plus lourdes et plus larges. Récemment, MASCALL & EVANS (1977), dans des conditions voisines, ont également observé la présence de telles espèces qu'ils supposent aussi résulter d'interactions entre la BuChE et des lipoprotéines.

En conclusion, bien qu'il soit à peu près certain que la BuChE est impliquée dans le métabolisme des lipoprotéines circulantes, son interaction structurale avec ces protéines nous pa-

raît, sinon contestable, du moins très limitée qualitativement et quantitativement. Par contre, il semble et c'est dans cette direction que nous orientons nos recherches, que les différentes formes de l'enzyme interagissent avec des phospholipides et que ceux-ci jouent un rôle important, tant structural dans la stabilisation des conformations, donc des oligomères, que fonctionnel en modifiant, par leur présence, les propriétés catalytiques de ces formes moléculaires.

6.2. L'interaction de la BuChE avec l' α_2 -macroglobuline.

L'électrophorèse en gradient de polyacrylamide résoud l' α_2 -macroglobuline (α_2 M) du sérum humain en deux bandes distinctes très rapprochées dont la plus anodique et aussi la plus intense apparaît être identifiable au complexe α_2 -M/protéase (dans le plasma, les deux bandes sont de même intensité) (ZAIS & ROBERTS, 1977). La présence d'une activité cholinestérasique située sur les deux composantes du doublet et semblant résulter de l'interaction C_1 - α_2 -macroglobuline est, en soi, intéressante. L' α_2 -macroglobuline est connue pour fixer les protéases et, notamment la trypsine, mais elle peut se lier à d'autres enzymes, en particulier à l'aspartate aminotransférase, ainsi qu'à des hormones et des peptides (LEBRETON de VONNE & MOURAY, 1974). PRUNIER et al. (1964) ont même suggéré que l' α_2 -macroglobuline serait un transporteur de protéines synthétisées dans différents tissus. L'interaction α_2 -macroglobuline - enzyme est encore très mal connue, mais on sait que l'association ne se fait pas par l'intermédiaire du site actif bien que l'activité des protéases complexées soit pratiquement inhibée. Selon BARRET & STARKEY (1973) ainsi que FRENOY & BOURILLON (1977), il y aurait, dans un premier temps, clivage d'une liaison peptidique de l' α_2 -macroglobuline, suivi d'une transconformation dont l'effet serait d'enfermer la protéase dans une zone interne. Seuls les substrats de petites tailles pourraient alors avoir accès au centre actif de l'enzyme. Nous avons montré que la BuChE conserve son activité lorsqu'elle est associée à l' α_2 -M, mais le mécanisme proposé pour les protéases semble difficilement applicable à notre cas. En effet, on ne voit pas comment peut se faire le clivage de la

liaison peptidique, et comment concevoir qu'une enzyme aussi riche en glucides que la BuChE, donc très hydrophile, puisse s'intégrer dans une zone interne de l' α_2 -M ?

La copule glucidique ne semble pas jouer un rôle dans cette association; en effet, l'action de la neuraminidase, si elle modifie considérablement la structure quaternaire de la BuChE, ne perturbe pas son interaction avec l' α_2 -M; on sait par ailleurs que les propriétés biologiques de l' α_2 -M qui est également une sialoglycoprotéine, ne sont pas modifiées après élimination de ses acides neuraminiques (HEIDE & SCHWICK, 1973).

Le problème de la nature de l'interaction de la BuChE avec l' α_2 -M reste donc posé; sa signification demeure tout aussi obscure. Il n'est pas impossible cependant que ces deux protéines dont le rôle biologique est encore inconnu soient impliquées ensemble, au moins partiellement, dans certains métabolismes : elles sont fortement augmentées dans les syndrômes néphrotiques et l'absence de déperdition rénale n'explique que partiellement l'augmentation du taux d' α_2 -macroglobuline (LEBRETON de VONNE & MOURAY, 1974).

6.3. Caractère peu vraisemblable d'une interaction de la BuChE avec l'albumine .

Il a été postulé que la butyrylcholinestérase et l'albumine sont synthétisées dans l'hépatocyte selon deux voies métaboliques parallèles ou interdépendantes. Bien que DIETZ et al. (1966) aient contredit cette hypothèse en montrant que l'activité cholinestérasique du sérum est normale dans l'analbuminémie, et inversement que le taux d'albumine est normal chez les patients présentant un déficit héréditaire en BuChE, que KUROSE (1971) ait montré qu'il y a pas de corrélation significative entre l'activité de l'enzyme et le taux de l'albumine, que SAEED et al. (1971) aient également écarté l'hypothèse d'une cholinestérase migrant à l'électrophorèse au niveau de l'albumine, LOBANOV et al. (1972) soutiennent l'idée que les formes multiples de la BuChE peuvent exister sous forme de complexes avec l'al-

bumine du sérum. Nos recherches situées dans le prolongement des travaux de LA MOTTA et al. (1968, 1970) par la démonstration de la relation de parenté, monomère, dimère, tétramère, et de l'interconvertibilité des formes C_1 , C_3 , C_4 qu'elles apportent, infirment cette hypothèse.

D'autre part, nous n'avons jamais détecté d'activité cholinestérasique au niveau de l'albumine (seule une activité estérasique se manifeste) et les expériences de dissociation des formes isolées n'ont jamais engendré d'albumine.

7. SIGNIFICATION DE L'EXISTENCE DU SYSTEME DE FORMES MULTIPLES .

Le rôle biologique de la BuChE demeurant inconnu, il serait hasardeux d'émettre des hypothèses sur l'éventuelle signification physiologique de ses formes multiples. On peut cependant dégager quelques orientations. Si l'on excepte le cas des formes dégradées (C_2 et $C_{pré4}$), le système monomère-dimère-tétramère se caractérise, au plan structural, essentiellement par la coexistence et la possibilité d'interconvertibilité de ses trois composantes et, au niveau fonctionnel, par des différences dans les propriétés catalytiques. Les transitions agrégation $\rightleftharpoons$ désagrégation peuvent supporter un système de régulation de l'activité ou traduire l'expression d'une spécialisation fonctionnelle. Ce problème soulevé par BALDWIN & HOCHACHKA (1970) et par GUILLON & MASSOULIE (1976) à propos du rôle des formes moléculaires multiples des AChE dans l'adaptation thermique des poissons, ne semble pas encore résolu. Cependant, les travaux en cours de CHAPOUTHIER (1977) sur la biochimie de l'empreinte chez le poulet suggèrent que celle-ci est préparée par une maturation cérébrale s'exprimant, en particulier, par un développement rapide de la forme lourde 11S d'AChE par rapport aux formes légères 6,5S et 4S.

Ainsi, bien que l'on connaisse des enzymes pour lesquelles la structure oligomérique n'est pas nécessaire au fonctionnement (CHAN, 1976), l'organisation des chaînes polypeptidiques en structure quaternaire entraîne, pour un grand nombre de protéines, l'acquisition de fonctions et des possibilités de régulation plus efficaces et

moins coûteuses pour la cellule; celle-ci réalise, en outre, une économie d'information et de matériel génétique. Cette organisation est le produit de l'évolution mais, comme tous les phénomènes liés au vivant, répond-elle ainsi que l'affirment les théories finalistes néo-lamarckiennes, à une nécessité ou, comme le pensent les néo-darwiniens, est-elle le fruit du hasard et de la nécessité; enfin, comme le postule KIMURA, est-elle l'aboutissement d'un ensemble de phénomènes purement stochastiques excluant la nécessité ?

Aucune réponse générale n'est, semble-t-il, satisfaisante pour le moment. Cependant, l'organisation régénérée et générative des systèmes vivants et leur évolution vers la complexité est caractéristique de l'organisation néguentropique. Comme l'a écrit Edgar MORIN (1977), la vie n'est qu'une forme particulière de l'organisation néguentropique qui s'inscrit dans le courant du développement et de la complexification de l'organisation, tout en s'inscrivant dans le courant de l'entropie et de la dispersion. La structure quaternaire et, en particulier, celle de la Butyrylcholinestérase, peut donc être considérée comme une manifestation, parmi d'autres, de l'émergence de la néguentropie en temps que processus actif et qualité organisationnelle sans qu'il soit nécessaire de préjuger de sa finalité.

CONCLUSION

Nous avons étudié les formes moléculaires multiples de la BuChE du sérum humain. Celles-ci connues depuis une quinzaine d'années avaient fait l'objet de nombreux travaux qui n'avaient pas abouti à préciser les interrelations existant entre elles ainsi que leur nature moléculaire exacte. Notre contribution a été d'une part de déterminer leurs propriétés physicochimiques, de démontrer leur nature oligomérique ainsi que les liens de parenté qui les unissent et d'autre part, de préciser la nature des liaisons qui s'établissent entre les sous-unités ainsi que les facteurs qui participent à leur stabilisation conformationnelle et de proposer un modèle moléculaire pour la structure spatiale de chaque forme.

Nos conclusions sont les suivantes :

1. Les formes C_1 (monomère), C_3 (dimère) et C_4 (tétramère) sont les différents stades de la structure quaternaire covalente de l'enzyme.

2. La forme C_2 , structuralement proche du dimère, nous paraît être un produit de dégradation de la forme C_4 plutôt que de C_3 .

3. Les deux monomères constituant la forme C_3 sont principalement liés par ponts disulfures. La forme C_4 apparaît être un dimère de dimères, mais l'association entre les deux unités ne semble pas impliquer de pont disulfure.

4. La forme C_2 est un dimère partiel constitué d'une sous-unité C_1 , liée par ponts disulfures à une sous-unité muette correspondant vraisemblablement à un monomère amputé d'un fragment glucidopeptidique.

5. Les propriétés hydrodynamiques permettent de concevoir les formes de la BuChE comme des protéines asymétriques; les deux dimères constituant la forme C_4 apparaissent être associés de façon quasi linéaire et légèrement excentrés.

6. Les différentes formes de la BuChE semblent interagir avec des molécules de nature phospholipidique qui paraissent jouer un rôle tant structural dans la stabilisation conformationnelle des oligomères, que fonctionnel comme modulateur de l'activité.

Lyon, février 1978.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMSON, E.D.
Acetylcholinesterase in mouse brain, erythrocytes and muscles.
J. Neurochem. (1977) 28, 605-615.
- AKOPYAN, A.B., GUKAZYAN, E.I., EGIАЗARYAN, A.G., ZOGRABYAN, Yu.G.
Copper oxidase (ceruloplasmine), cholinesterase, and phosphomono-
esterase-1 activity of the blood serum of patients with tuberculosis
of the kidney . [en russe]
Zh. Eksp. Klin. Med. (1976) 16 (1), 99-103.
- ALDRIGE, W.N.
Serum esterases. I. Two types of esterases (A and B) hydrolysing
p-nitrophenyl acetate, propionate, and butyrate and a method for
their determination.
Biol. J. (1953) 53, 110-117.
- ANDREINI, G.C., POMPA, G., MARRARI, P., ORMAS, P.
Impiego delle ossime in vitro per la valutazione della attività
pseudocolinesterasica serica in presenza di esteri fosforici.
Att. Soc. Ital. Biol. Sper. (1974) 2, 411-412.
- ANDREWS, P.
Estimation of molecular size and molecular weights of biological
compounds by gel filtration.
Meth. Biochem. Anal. (1970) 18, 1-53.
- ANKER, H.S.
A solubilizable acrylamide gel for electrophoresis.
FEBS Lett. (1970) 7 (3), 293.
- ASHWELL, G., MORELL, A.G.
The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and
transport of circulating glycoproteins.
Advances in Enzymol. (1974) 41, 99-128.
- ASHWELL, G., MORELL, A.G.
Membrane glycoproteins and recognition phenomena.
T.I.B.S. (1977) 2, 76-77.

AUGUSTINSSON, K.B.

Electrophoretic separation and classification of blood plasma esterases.
Nature (1958) 181, 1786-1789.

AUGUSTINSSON, K.B.

Electrophoresis studies on blood plasma esterases. I. Mammalian plasmata.
Acta Chem. Scand. (1959) 13, 571-592.

AUGUSTINSSON, K.B., EKEDAH, G.

On the specificity of arylesterases.
Acta Chem. Scand. (1962) 16, 240-241.

AUGUSTINSSON, K.B., EKEDAH, G.

The properties of neuraminidase-treated serum cholinesterase.
Biochem. Biophys. Acta (1962b) 56, 392-393.

AUGUSTINSSON, K.B.

The nature of an "anionic" site in butyrylcholinesterase compared with that of a similar site in acetylcholinesterase.
Biochim. Biophys. Acta (1966) 128, 351-362.

AUGUSTINSSON, K.B.

Determination of activity of cholinesterases.
Methods of Biochem. Anal. (1971) suppl. vol., 217-273.

AUGUSTINSSON, K.B.

Molecular properties of serum cholinesterase.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. (1973) 354, 1-2.

AUGUSTINSSON, K.B., BARTFAI, T., MANNERVIK, B.

A steady-state kinetic model of butyrylcholinesterase from horse plasma.
Biochem. J. (1974) 141, 825-834.

AUGUSTINSSON, K.B., ERIKSSON, H.

The relation mechanism of butyrylcholinesterase.
Croat. Chem. Acta (1975) 47 (3), 277-285.

BALDWIN, J., HOCHACHKA, P.W.

Functional significance of isoenzymes in thermal acclimatation.

Acetylcholinesterase from trout brain.

Biochem. J. (1970) 116, 883-887.

BARRET, A.J., STARKEY, P.M.

The interaction of α_2 M with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction and a hypothesis concerning its molecular mechanism.

Biochem. J. (1973) 133, 709-724.

BARTON, R.J.

Anomalous behaviour of bovine serum albumin in electrophoresis on non-denaturing polyacrylamide gel.

Biochem. J. (1972) 129, 983-985.

BEAUREGARD, G., ROUFOGALIS, B.D.

The role of tightly bound phospholipid in the activity of erythrocyte acetylcholinesterase.

Biochem. Biophys. Res. Communic. (1977) 77 (1), 211-219.

BEHLKE, J.

In the differentiation of association, aggregation and polymerization events.

Studia Biophysica (1976) 58 (1), 79-80.

BERGMEYER, H.U.

Methods of enzymatic analysis.

Academic Press (1965).

BERNSOHN, J. BARRON, K.D., HESS, A.R.

Cholinesterases in serum demonstrated by starch gel electrophoresis.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. (1961) 108, 71-73.

BERRY, W.K.

Cholinesterase in human serum.

Biochim. Biophys. Acta (1960) 39, 346-348.

- BLOOMFIELD, V., DALTON, W.O., VAN HOLDE, K.E.
Frictional coefficients of multisubunit structures. I. Theory.
Biopolymers (1967) 5, 135-148.
- BOEHRINGER MANNHEIM FRANCE S.A.
Détermination de l'activité de la cholinestérase dans le sérum.
Test-Mémo n° 7 (1975).
- BON, S., RIEGER, F., MASSOULIE, J.
Propriétés des formes allongées de l'acétylcholinestérase en solution.
Rayon de STOKES, densité et masse.
Eur. J. Biochem. (1973) 35, 372-379.
- BON, S., MASSOULIE, J.
An active monomeric form of Electrophorus electricus acetylcholinesterase.
FEBS Lett. (1976) 67 (1), 99-103.
- BON, S., MASSOULIE, J.
Molecular forms of Electrophorus acetylcholinesterase. The catalytic
subunits : fragmentation, intra and intra-subunit disulfide bonds.
FEBS Lett. (1976b) 71 (2), 273-278.
- BORISOVA, M.A.
Activity of blood serum cholinesterase and catalase as an index of the
course of typhus abdominalis . [en russe]
Vrach. Delo (1966) 10, 110-112.
- BOTTEX, C., FONTANGES, R.
La neuraminidase.
Lyon Pharm. (1976) 27 (4), 327-348.
- BOUTIN, D., BRODEUR, J.
Human serum pseudocholinesterases : Molecular weight estimation of a
subunit structure.
Can. J. Physiol. Pharmacol. (1971) 49 (8), 777-779.
- BOYADJIEV, S.
Changes in cholinesterase activity in white rats, after several injections
of TMB-4 and Atropine, following treatment with Parathion.
Folia Medica (1974) 16, 281-285.

BRESTKIN, A.P., ROZENGART, E.V.

Cholinesterase catalysis.

Nature (1965) 205, 388-389.

BRODBECK, U., GENTINETTA, R., LUNDIN, S.J.

Multiple forms of a cholinesterase from body muscle of plaice (Pleuronectes platessa) and possible role of sialic acid in cholinesterase reaction specificity.

Acta Chem. Scand. (1973) 27, 561-572.

BRODBECK, U., OTT, P., WIEDNER, T.

Comparative studies on the molecular properties of purified acetylcholinesterase from human erythrocytes and from the electric organ of Electrophorus electricus.

Croat. Chem. Acta (1975) 47 (3), 201-210.

BULL, H.B.

Electrophoresis and electrokinetic potential.

in An Introduction to Physical Biochemistry, F.A. DAVIS Co, Philadelphia (1971) 327-359.

BULLOCK, T.H., NACHMANSOHN, D.

Cholinesterase in primitive nervous system.

J. Cell. Comp. Physiol. (1942) 20, 239-242.

BURGER, S.P., FUJII, T., HANAHAN, D.J.

Stability of the bovine erythrocyte membrane. Release of enzymes and lipid components.

Biochemistry (1968) 7, 3682-3700.

CANN, J.R., GOAD, W.B.

Two or more electrophoretic zones from a single macromolecule.

Ann. N.Y. Acad. Sci. (1968) 151, 638-649.

CANN, J.R.

Implication of macromolecule-small molecule interactions and kinetically controlled reactions for separation of proteins by mass transport. Isoenzymes; Int. Conf., 3rd.(1974) [Pub.1975] 1, 837-851, Academic N.Y.

CANN, J.K., LINDSAY, D.I.

Isoelectric focusing of interacting systems.

I - Carrier ampholyte-induced macromolecular isomerization.

II- pH-dependent conformational transitions.

Biophys. J. (1977) 21, 103-120.

CARUBELLI, R., YEH, A.K.

Neuraminidase activity in human lymphocytes and human polymorphonuclear leucocytes.

Behring Inst. Mitt. (1974) 55, 88-90.

CASTAIGNE, P., LAMBIER, J., SCHULLER, E.

Dosage des protéines totales et de certaines globulines du liquide céphalo-rachidien : Application de l'analyse automatique aux techniques de fractionnement chimique. I - Dosage des protéines totales du liquide céphalo-rachidien.

Rev. Franc. Et. Clin. Biol. (1965) 10, 529-546.

CHAN, W. W.-C.

Some experimental approaches for studying subunit interactions in enzymes.

Can. J. Biochem. (1976) 54 (6), 521-528.

CHANGEUX, J.P.

Responses of acetylcholinesterase from Torpedo marmorata to salts and curarising drugs.

Mol. Pharmacol. (1966) 1, 369-392.

CHAPOUTHIER, G.

La biochimie de l'empreinte.

La Recherche (1977) 8 (83), 994-995.

CHARLWOOD, P.A.

Partial specific volumes of proteins in relation to composition and environment.

J. Am. Chem. Soc. (1957) 79, 776-781.

CHEN, Y.T., ROSENBERRY, T.L., CHANG, H.W.

Subunit heterogeneity of acetylcholinesterase.

Arch. Biochem. Biophys. (1974) 161, 479-487.

CHIU, Y.C., TRIPATHI, R.K., O'BRIEN, R.D.

Gel scanning method for kinetic studies on an acetylcholinesterase isoenzyme.

Anal. Biochem. (1972a) 45 (2), 480-487.

CHIU, Y.C., TRIPATHI, R.K., O'BRIEN, R.C.

Differences in reactivity of four butyrylcholinesterase isoenzymes towards substrate and inhibitors.

Biochem. Biophys. Res. Communic. (1972b) 46 (1), 35-42.

CHOTHIA, C., JANIN, J.

Principles of protein-protein recognition.

Nature (1975) 256, 705-708.

CHRAMBACH, A., RODBARD, D.

Polyacrylamide gel electrophoresis.

Science (1971) 172, 440-451.

CHRISTIAN, S. L., BEASLEY, J. G.

Michaelis constants for isolated cholinesterase systems.

J. Pharm. Sci. (1968) 57, 1025-1027.

CLITHEROW, J.W., MITCHARD, M., HARPER, N.J.

The possible biological function of pseudocholinesterase.

Nature (1963) 199, 1000-1001.

COHN, E.J., EDSALL, J.T.

Density and apparent specific volume of proteins.

in Proteins, aminoacids and peptides as ions and dipolar ions.

Rheinhold Pub. Corp. N.Y. (1943) 370-381.

CORNISCH-BOWDEN, A.J., KOSHLAND, Jr, D.E.

The quaternary structure of proteins composed of identical subunits.

J. Biol. Chem. (1971) 246 (10), 3092-3102.

COX, H.C., TEVEN, J.M.G.

On the mechanism of the molecular-sieve effect in polyacrylamide gel electrophoresis.

J. Chromatogr. (1976) 123, 261-270.

CRAINE, J.E., DANIELS, G.H., KAUFMAN, S.

Dopamine β -hydroxylase. The subunit structure and anion activation of the bovine adrenal enzyme.

J. Biol. Chem. (1973) 248 (22), 7838-7844.

D

DAS, P.K., TIDDELL, J.

Purification and properties of human serum cholinesterase.

Biochem. J. (1970) 116, 875-881.

DAS, P.K., TIDDELL, J., GOEDDE, P.W.

Heterogeneity and partial purification of human erythrocyte membrane acetylcholinesterase.

Hoppe-Seyler's Zeit. Für Physiol. Chem. (1977) 358 (2), 149-158.

DAVIES, G.E., STARK, G.R.

Use of dimethylsuberimidate, a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1970) 66 (3), 651-656.

DAVIS, B.J.

Disc-electrophoresis. II - Method and application to human serum proteins.

Ann. N.Y. Acad. Sci. (1964) 121, 404-427.

DEGANI, Y., MIRON, T.

Immobilization of cholinesterase in cross-linked polyacrylamide.

Biochim. Biophys. Acta (1970) 212, 362-364.

DESIRE, B., BLANCHET, G., PHILIBERT, H.

Activité de l'acétylcholinestérase d'érythrocyte à faible force ionique.

Biochimie (1973) 55, 643-646.

DIETZ, A.A., RUBINSTEIN, M.H., LUBRANO, T.

Serum cholinesterase in analbuminemia.

Clin. Chem. (1966) 12, 25-27.

DIMOV, D. PETKOV, I., ZLATKOV, N. DURMISHEV, A., JORDANOVA, I.
Determination of some enzymes in the blood serum of patients with
vitiligo before and after heliotherapy.
Česk. Dermatol. (1976) 51 (3) 148-152.

DION, J.L.
Ondes et vibrations.
C.E.C. ed. Québec (1974)

DUBBS, C.A., VIVONIA, C., HILBURN, J.M.
Subfractionation of human serum enzymes.
Science (1960) 131, 1529-1531.

DUBBS, C.A.
Ultrasonic effects on isoenzymes.
Clin. Chem. (1966) 12, 181-186.

DUDAI, Y., SILMAN, I., KALDERON, N., BLUMBERG, S.
Purification by affinity chromatography of acetylcholinesterase from
electric organ tissue of the electric eel subsequent to tryptic
treatment.
Biochim. Biophys. Acta (1972) 268, 138-157.

DUDAI, Y. SILMAN, I.
The molecular weight and subunit structure of acetylcholinesterase
preparations from the electric organ of the electric eel.
Biochem. Biophys. Res. Communic. (1974a) 59 (1), 117-124.

DUDAI, Y., SILMAN, I.
The effect of solubilization procedures on the release and molecular
state of acetylcholinesterase from electric organ tissue.
J. Neurochem. (1974b) 23, 1177-1187.

E

EDELSTEIN, S.J., SCHACHMAN, H.K.
The simultaneous determination of partial specific volumes and mole-
cular weights with microgram quantities.
J. Biol. Chem. (1967) 242 (2), 306-311.

Oximes antagonistic to inhibitors of cholinesterase.

J. Pharm. Sci. (1964) 53, 995-1006.

A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.

Biochem. Pharmacol. (1961) 7, 88-95.

ENGELHARD, N., PRCHAL, K., NENNER, M.

Acetylcholinesterase.

Angew. Chem. Internat. Edit. (1967) 6 (7), 615-626.

An approach to the problem of conformational isozymes.

Ann. N.Y. Acad. Sci. (1968) 151, 85-101.

EVANS, F.T., GRAY, P.W.S., LEHMANN, H.

Effect of pseudo-cholinesterase level on action of succinylcholine in man.
Brit. Med. J. (1963) 1, 106-106.

EYLAR, E.H.

On the biological role of glycoproteins.

J. Theor. Biol. (1965) 10, 89-113.

FIDDES, J.C.

La séquence nucléotidique d'un ADN viral.

Ann. la Science (1973) 30, 107-127.

FISHBEIN, W.N., NAGARAJAN, K., SCURZI, W.

Urease catalysis and structure.

VI- Correlation of sedimentation coefficients and electrophoretic mobilities for the polymeric urease isozymes.

J. Biol. Chem. (1970) 245 (22), 5985-5992.

FISHBEIN, W.N., NAGARAJAN, K.

Urease catalysis and structure.

VIII- Ionic strength dependence of urease polymerization and polymer pI.
Arch. Biochem. Biophys. (1972) 151, 370-377.

FISHBEIN, W.N., NAGARAJAN, K., SCURZI, W.

Urease catalysis and structure.

IX- The half-unit and hemipolymers of jack bean urease.
J. Biol. Chem. (1973) 248 (22), 7870-7877.

FISHBEIN, W.N., ENGLER, W.F., GRIFFIN, J.L., SCURZI, W., BAHR, G.F.

Electron microscopy of negatively stained jack bean urease at three levels of quaternary structure, and comparison with hydrodynamic studies.
Eur. J. Biochem. (1977) 73, 185-190.

FISHER, H.

A limiting law relating the size and shape of protein molecules to their composition.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1964) 51, 1285-1291.

FREJAVILLE, J.P.

Toxicologie clinique et analytique, Flammarion (1971) 466-472.

FRENOY, J-P., BOURILLON, R.

Subunit structure of human α_2 macroglobulin (α_2 MG) with respect to its interaction with trypsin.

Biochimie (1977) 59, 351-354.

FUNNEL, H.S., OLIVER, W.T.

Proposed physiological function for plasma cholinesterase.

Nature (1965) 208, 689-690.

G

GAFFNEY, P.J.

Human serum cholinesterase.

I- Partial purification and nature of the heterogeneity of this system.

Biochim. Biophys. Acta (1970) 207, 465-476.

GALIBERT, F.

Une date en biologie moléculaire.

Ann. N.Y. Acad. Sci. (1971) 211, 91-93.

GARRY, P.J., ROUTH, J.I.

A micro method for serum cholinesterase.

Clin. Chem. (1965) 11 (2), 91-96.

GARRY, P.J.

A manual and automated procedure for measuring serum cholinesterase activity and identifying enzyme variants.

Clin. Chem. (1971) 17 (3), 192-198.

GEIGY

Tables scientifiques, 7ieme éd. (1972).

GIELEN, W.

Neuraminidase in higher organisms.

Behring Inst. Mitt. (1974) 55, 85-88.

GLADKIKH, A.S.

Rare atypical electrophoretic variants of serum cholinesterase.

Sud. Med. Ekspertiza, (1971) 14 (2), 20-25 . [en russe] .

GORDON, M.A., CHAN, S.L., TREVOR, A.J.

Active-site determinations on forms of mammalian brain and eel acetylcholinesterase.

Biochem. J. (1976) 157, 69-76.

GOTTSCHALK, A.

Glycoproteins. Their composition, structure and function.

Elsevier pub. Co. (1966).

GRAFIUS, M.A., MILLARD, D.B.

Reversible aggregation of acetylcholinesterase.

Biochim. Biophys. Acta (1965) 110, 540-547.

GRAFIUS, M.A., BOND, H.E., MILLAR, D.B.

Acetylcholinesterase interaction with a lipoprotein matrix.

Eur. J. Biochem. (1971) 22, 382-390.

GUILBAULT, G.G., KUAN, S.S., TULLY, S., HACKNEY, D.

New procedure for rapid and sensitive detection of cholinesterase separated by polyacrylamide gel electrophoresis.

Anal. Biochem. (1970) 36, 72-77.

GUILLON, G., MASSOULIE, J.

Multiplicité des formes moléculaires de l'acétylcholinestérase et acclimatation thermique chez le Carassius auratus.

Biochimie (1976) 58, 465-471.

HAJDU, J., BARTHA, F., FRIEDRICH, P.

Crosslinking with bifunctional reagents as a means for studying the symmetry of oligomeric proteins.

Eur. J. Biochem. (1976) 68, 373-383.

HAJDU, J., WYSS, S.R., AEBI, H.

Properties of human erythrocyte catalases after crosslinking with bifunctional reagents. Symmetry of the quaternary structure.

Eur. J. Biochem. (1977) 80, 199-207.

HARRIS, H., WHITTAKER, M.

Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride. Recognition of two new phenotypes.

Nature (1961) 191, 496-498.

HARRIS, H., HOKINSON, D.A., ROBSON, E.B.

Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in normal human serum.

Nature (1962) 196, 1296-1298.

HARRIS, H., ROBSON, E.B.

Fractionation of human serum cholinesterase components by gel filtration.

Biochim. Biophys. Acta (1963) 73, 649-652.

HARRIS, H. ROBSON, E.B., GLEN-BOTT, A.M., THORNTON, J.A.
Evidence for non-allelism between genes affecting human serum
cholinesterase.

Nature (1963) 200, 1185-1187.

HAUPT, H. HEIDE, K., SWISLER, O., SCHWICK, H.G.
Isolierung und physikalisch-chemische Charakterisierung der Cholinesterase aus Humanserum.

Blut (1966) 14, 65-75.

HEDRICK, J.L., SMITH, A.

Size and charge isomer separation and estimation of molecular
weights of proteins by disc gel electrophoresis.

Arch. Biochem. Biophys. (1968) 126, 155-164.

HEIDE, K., SCHWICK, H-G.

Chemistry and significance of the carbohydrate moieties of human
serum glycoproteins.

Angew. Chem. Internat. Edit. (1973) 12 (9), 721-733.

HEILBRONN, E.

Purification of cholinesterase from horse serum.

Biochim. Biophys. Acta (1962) 58, 222-230.

HENN, S.W., ACKELS, G.K.

Molecular sieve studies of interacting protein systems. V- Association of subunits of D-Amino acid oxydase apoenzyme.

Biochemistry (1969) 8 (9), 3829-3838.

HERZ, F., KAPLAN, L.

Human erythrocyte acetylcholinesterase.

Pediat. Res. (1973) 7, 204-214.

HESS, A.R., ANGEL, R.W., BARRON, K.D., BERNSOHN, J.

Proteins and isoenzymes of esterases and cholinesterase from sera
of different species.

Clin. Chim. Acta (1963) 8, 656-667.

HELSC, E. I., CHUN, F. H. L., KROENKE, G. I.

Sonic energy effects in bovine serum albumin solutions.
Science (1964) 143, 1176-1177.

HIEBERT, M., GAULDIE, J., HILLCOAT, B.L.

Multiple enzymes forms from protein-bromophenol blue interaction
during gel electrophoresis.

Anal. Biochem. (1972) 46 (2), 433-437.

HILL, T. I.

Général theory of the isoelectric point.

J. Phys. Chem. (1942) 46, 417-428.

HUCHO, F., MÜLLNER, H., SUND, H.

Investigation of the symmetry of oligomeric enzymes with bifunctional
reagents.

Eur. J. Biochem. (1975) 59, 79-87.

HUTCHINSON, D.W., KABAYO, J.P.

Current thoughts on neuraminidase.

T.I.B.S. (1977) 1 (1), 1-3.

I

IUPAC - IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CNB)

The Nomenclature of Multiple Forms of Enzymes.

Recommendations (1971).

Arch. Biochem. Biophys. (1971) 147, 1-3.

IUPAC - IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CNB)

The Nomenclature of Multiple Forms of Enzymes.

Recommendations (1976).

J. Biol. Chem. (1977) 252 (17), 5239-5241.

- JANSZ, H.S., BRONS, D., WARRINGA, M.G.P.J.
Chemical nature of the DFP-binding site of pseudocholinesterase.
Biochem. Biophys. Acta (1959) 34, 573-575.
- JANSZ, H.S., COHEN, J.A.
Pseudocholinesterase from horse serum.
I- Purification and properties of the enzyme.
Biochim. Biophys. Acta (1962) 56, 531-537.
- JEANLOZ, R.W.
in Glycoproteins. GOTTSCHALK, A., Ed., 2nd Ed. Part A. Elsevier
publ. Co (1972) 565-611.
- JOLLEY, W.B., ALLEN, H.W., GRIFFITH, O.M.
Ultracentrifugation using acrylamide gel.
Anal. Biochem. (1967) 21, 454-561.
- JONES, G.L., MASTERS, C.J.
On the nature and characteristics of the multiples forms of catalase
in mouse liver.
Arch. Biochem. Biophys. (1975) 169, 7-21.
- JUDAH, J.D., QUINN, P.S.
On the biosynthesis of serum albumin.
T.I.B.S. (1976) 2, 107-109.
- JUUL, P
Human plasma cholinesterase isoenzymes.
Clin. Chim. Acta (1968) 19, 205-213.

K

- KABACHNIK, M.I., BRESTKIN, A.P., GODOVIKOV, N.N., MICHELSON, M.J.,
ROZENGART, E.V., ROZENGART, V.I.
Hydrophobic areas on the active surface of cholinesterases.
Pharmacol. Rev. (1970) 22, 355-388.

KALOW, W., GENEST, K.

A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers.

Can. J. Biochem. (1957) 35, 339-346.

KALOW, W.

The influence of pH on the hydrolysis of benzoylcholine by pseudocholinesterase of human plasma.

Can. J. Physiol. Pharmacol. (1964) 42, 161-168.

KAMARIĆ, L.

Allosteric reactions of horse serum cholinesterase.

Croat. Chem. Acta (1975) 47 (3), 287-297.

KAPLAN, N.O.

Nature of multiple molecular forms of enzymes.

Ann. N.Y. Acad. Sci. (1968) 151 (1), 382-399.

KARCZMAR, A.G.

Anticholinesterase agents, Pergamon Press (1970) volume I.

KARNOVSKY, M.J., ROOTS, L.

A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases.

J. Histochem. Cytochem. (1964) 12, 219-220.

KASHYAP, S.K., GUPKA, S.K.

Significance of blood cholinesterase enzymes as an index to evaluate exposure to organophosphorus insecticides.

Pesticides (1976) 10 (1), 36-38.

KATES, M., SASTRY, P.S.

Phospholipase-D.

Methods in Enzymology (1969) 14, 197-203.

KEIJER, J.H., WOLRING, G.Z., DE JONG, L.P.A.

Effect of pH, temperature and ionic strength on the aging of phosphorylated cholinesterases.

Biochim. Biophys. Acta (1974) 334, 146-155.

KENDAL, A.F., LICKERT, E.A.

The preparation and properties of ^{14}C -carboxamidomethylated subunits from A₂/1957 influenza neuraminidase.

Biochim. Biophys. Acta (1972) 263, 424-495.

KENNEY, W.C.

Molecular nature of isozymes.

Horiz. Biochem. Biophys. (1974) 1, 38-61.

KIRKWOOD, J.G.

The general theory of irreversible processes in solutions of macromolecules.

J. Polymer. Sci. (1954) 12, 1-14.

KLOTZ, I.M., LANGERMAN, N.R., DARNALL, D.W.

Quaternary structure of proteins.

Ann. Rev. Biochem. (1975) 39, 25-62.

KLOTZ, I.M. DARNALL, D.W., LANGERMAN, N.R.

Quaternary structure of proteins.

Proteins, 3rd edition, NEURATH, H. Ed., Academic.N.Y. (1975) 293-411.

KNEDEL, M. BÖTTGER, R.

Eine kinetische Methode zur Bestimmung der Aktivität der Pseudo-cholinesterase.

Klin. Wschr. (1967) 45, 325-327.

KOELLE, W.A., KOELLE, G.B., SMYRL, E.G.

Effect of persistent selective suppression of ganglionic butyrylcholinesterase on steady state and regenerating level of acetylcholinesterase : Implications regarding function of butyrylcholinesterase and regulation of protein synthesis.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1976) 73 (8), 2936-2938.

KOELLE, W.A., SMYRL, E.G., RUCH, G.A., SIDDON, V.E., KOELLE, G.B.

Effects of protection of butyrylcholinesterase on regeneration of acetylcholinesterase.

J. Neurochem. (1977a) 28, 307-311.

KOELLE, G.B., KOELLE, W.A., SMYRL, E.G.

Effects of inactivation of butyrylcholinesterase on steady state and regenerating levels of ganglionic acetylcholinesterase.

J. Neurochem. (1977b) 28, 313-319.

KOPPERSCHLÄGER, G., USBECK, E., HOFMAN, E.

Studies on the oligomeric structure of yeast phosphofructokinase by means of cross-linking diimidoesters.

Biochem. Biophys. Res. Communic. (1976) 71 (1), 371-378.

KORNFELD, R., KORNFELD, S.

Comparative aspects of glycoprotein structure.

Ann. Rev. Biochem. (1976) 45, 217-237.

KUNTZ, Jr, I.D., KAUZMANN, W.

Hydratation of proteins and polypeptides.

Advances in Prot. Chem. (1974) 28, 239-345.

KUROSE, K.

Plasma Cholinesterase : Clinical Studies. [en japonais] .

Seibutsu Butsuri Kagaku (1971) 16 (1), 51-58.

KUTTY, K.M., ROWDEN, G., COX, A.R.

Interrelationship between serum β -lipoprotein and cholinesterase.

Can. J. Biochem. (1973) 51, 883-887.

KUTTY, K.M., REDHEENDRAN, R., MURPHY, D.

Serum Cholinesterase : Function in lipoprotein metabolism.

Experientia (1977) 33 (4), 420-422.

L

LA DU, B.N.

Plasma esterase activity and the metabolism of drugs with ester groups.

Ann. N.Y. Acad. Sci. (1971) 179, 684-694.

LA DU, B.N., CHOI, Y.S.

Separation of atypical and usual forms of human serum cholinesterase by affinity chromatography.

Isoenzymes, Int. Conf. 3rs 1974 (Pub. 1975) 2, 877-886.

Ed. MARKERT, C. Academic N.Y.

LAI, C.Y., NAKAI, N., CHANG, D.

Aminoacid sequence of rabbit muscle aldolase and the structure of the active center.

Science (1974) 183, 1204-1206.

LAIDLER, K.J., BUNTING, P.S.

Supported enzyme systems.

in The chemical Kinetics of enzyme action.

Clarenton Press, Oxford (1973) 382-412.

LA MOTTA, R.V., McCOMB, R.B., WETSTONE, H.J.

Isozymes of serum cholinesterase : a new polymerization sequence.

Can. J. Physiol. Pharmacol. (1965) 43, 313-318.

LA MOTTA, R.V. McCOMB, R.B., NOLL, C.R., WETSTONE, H.J., REINFRANK, R.F.

Multiple forms of serum cholinesterase.

Arch. Biochem. Biophys. (1968) 124, 299-305.

LA MOTTA, R.V., WORONICK, C.L., REINFRANK, R.F.

Multiple forms of serum cholinesterase : Molecular weights of the isoenzymes.

Arch. Biochem. Biophys. (1970) 136, 448-451.

LA MOTTA, R.W., WORONICK, C.L.

Molecular Heterogeneity of human serum cholinesterase.

Clin. Chem. (1971) 17, 135-144.

LAMY, J., LAMY, J., COMPIN, S., WEILL, J.

Aspects théoriques et pratiques des nouvelles méthodes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient de pH et gradient de porosité.

Ann. Biol. Clin. (1971) 29, 125-143.

LAWLER, H.C.

Purification and properties of acetylcholinesterase polymers.

J. Biol. Chem. (1963) 238 (1), 132-137.

LEBRETON de VONNE, T., MOURAY, H.

Les alpha-macroglobulines.

Ann. Biol. Clin. (1974) 32, 185-196.

LEE, J.C., HARPST, J.A.

Physical properties and subunit structure of butyrylcholinesterase from horse serum.

Biochemistry (1973) 12 (8), 1622-1630.

LEESE, C.L.

Enzymes and Isoenzymes.

Ciba Found. Symp. Homeostatic Regulators. (1969) 144-161.

LEEUWIN, R.S.

Effect of the thyroid gland on pseudocholinesterase activity in liver and serum of the rat.

Acta Endocrin. (1966) 52, 368-374.

LEHMANN, H., SILK, E., LIDDELL, J.

Pseudo-cholinesterase.

Brit. Med. Bull. (1961) 17, 230-233.

LEUZINGER, W., GOLDBERG, M., CAUVIN, E.

Molecular properties of acetylcholinesterase.

J. Mol. Biol. (1969) 40 (2), 217-225.

LEWIS, U.L., PETERSON, S.M., BONEWALD, L.F., SEAVEY, B.K., WILLARD, P.

An interchain disulfide dimer of human growth hormone.

J. Biol. Chem. (1977) 252 (11), 3697-3702.

LIDDELL, J.H., LEHMANN, H., SILK, E.

A "silent" pseudocholinesterase gene.

Nature (1962) 193, 561-562.

LLOYD, C.W.

Sialic acid and the social behaviour of cells.

Biol. Rev. (1975) 50, 325-350.

LOBANOV, M.M., ROZENGART, V.I., RUBINA, Kh. M.

Electrophoretic and chromatographic characteristics of different forms of human and rat serum cholinesterase.

Ukr. Biokhim. Zh. (1971) 43 (4), 475-480 [en russe] .

LOBANOV, M.M., ROZENGART, V.I., RUBINA, Kh. M.
Kinetic properties and structural characteristics of human
blood serum cholinesterase isoenzymes.
Biochemistry [traduction américaine de Biokhimiya] (1972)
37, 328-332.

LOCKRIDGE, O., LA DU, B.N.
Comparison of atypical and usual human serum cholinesterase.
Purification, number of active sites, substrate affinity and
turn over number.
J. Biol. Chem. (1978) 253 (2), 361-366.

LOISELET, J., SABBAGH, W., SROCIJI, G.
Cholinestérase sérique et acétylcholinestérase globulaire dans
89 cas de cancer.
Ann. Biol. Clin. (1968) 26, 659-664.

LONG, K.R.
Cholinesterase activity as a biological indicator of exposure
to pesticides.
Int. Arch. Occup. Environ. Hlth. (1975) 36, 75-86.

LOWRY, O.H. ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. (1951) 193, 265-275.

M

McCANN, W.F.X., ROSENBERRY, T.L.
Identification of discrete disulfide - linked oligomers which
distinguish 18S from 14S acetylcholinesterase.
Arch. Biochem. Biophys. (1977) 183, 347-352.

McCLARD, R.W., KOLENBRANDER, H.M.
Resolution of temperature-dependant conformers of Histidine
ammonia-lyase on disc-gel electrophoresis : correlation with

Arrhenius discontinuities.

Experientia (1974) 30, 730-731.

MAIN, A.R.

Kinetic evidence of multiple reversible cholinesterases.

J. Biol. Chem. (1969) 244 (4), 829-840.

MAIN, A.R., TARKAN, E., AULL, J.L., SOUCIE, W.G.

Purification of horse serum cholinesterase by preparative polyacrylamide gel electrophoresis.

J. Biol. Chem. (1972) 247 (2), 566-571.

MAIN, A.R., McKELLY, S.C., BURGESS-MILLER, S.K.

A subunit-sized Butyrylcholinesterase present in high concentrations in pooled rabbit serum.

Biochem. J. (1977) 167, 367-376.

MANWELL, C.

A simplified electrophoretic system for determining molecular weights of proteins.

Biochem. J. (1977) 165, 487-495.

MARGOLIS, J. KENRICK, K.G.

Polyacrylamide gel electrophoresis in a continuous molecular sieve gradient.

Anal. Biochem. (1968) 25, 347-362.

MARKERT, C.L., MØLLER, F.

Multiple forms of enzymes : tissue, ontogenetic, and species specific patterns.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1959) 45, 753-763.

MARKERT, C.L.

The molecular basis of isoenzymes.

Ann. N.Y. Acad. Sci. (1968) 151, 14-40.

MARKERT, C.L.

Biology of isoenzymes.

Isoenzymes, Int. Conf., 3rd (1974)

(Pub 1975, Academic N.Y.) 1, 1-9.

MARTIN, R.G., AMES, B.N.

A method for determining the sedimentation behavior of enzymes :

Application to protein mixtures.

J. Biol. Chem. (1961) 236 (5), 1372-1379.

MARTINEZ DE MELIÁN, E.R., MORERO, R.D., FARIAS, R.N.

Multiple forms of acetylcholinesterase from rat erythrocytes.

Effect of fat-free diet.

Biochim. Biophys. Acta (1976) 422, 127-137.

MASCALL, G.C., EVANS, R.T.

Study of serum cholinesterase variants by means of one and two-dimensional electrophoresis in density gradient polyacrylamide.

J. Chromatogr. (1977) 143, 77-82.

MASSON, P.

Détermination de la mobilité électrophorétique libre des protéines par électrophorèse en gradient de polyacrylamide.

Manuscrit soumis pour publication dans Journal of Chromatography, (1978) .

MASSOULIE, J, BON, S., RIEGER, F., VIGNY, M.

Molecular forms of acetylcholinesterase.

Croat. Chem. Acta (1975) 47 (3), 163-179.

MATTICE, W.L., RISER, J.M., CLARK, D.S.

Conformational properties of the complexes formed by proteins and sodium dodecyl sulfate.

Biochemistry (1976) 15 (19), 4264-4271.

MAURER, H.R.

Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis.

Walter de Gruyter, Berlin, N.Y. (1971).

MEISTER, A.

Reduction of α , γ -keto and α -keto acids catalysed by muscle preparations and by crystalline lactic dehydrogenase.

J. Biol. Chem. (1950) 184, 117-129.

MENDOZA, C.E., SHIELDS, J.B., AUGUSTINSSON, K.B.

Arylesterases from various mammalian sera in relation to cholinesterases, carboxylesterases and their activity towards some pesticides.

Comp. Biochem. Physiol. (1976) 55 C, 23-26.

MERCK, E.

In Clinical laboratory, 11 th.Ed. (1974) 168-170.

MEZINCESCO, M.D., GHETIE, S.

La fonction métabolique de la butyrylcholinestérase.

Biochim. Biophys. Acta (1974) 350, 54-60.

MILLER, L.K., DIAZ, S.C., SHERMAN, M.R.

Steroid-receptor quantitation and characterization by electrophoresis in highly cross-linked polyacrylamide gels.

Biochemistry (1975) 14 (20), 4433-4443.

MONE, J.G., MATHIE, W.E.

Qualitative and quantitative defects of pseudocholinesterase activity.

Anaesthesia (1967) 22 (1), 55-68.

MOON, T.W.

Temperature adaptation : isozymic function and maintenance of heterogeneity.

Isoenzymes, Int. Conf., 3rd (1974) (pub 1975) 2, 207-220, Academic Press.

MORELL, A.G., GREGORIADIS, G., SCHEINBERG, I.H., HICKMAN, J., ASHWELL, G.

The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation.

J. Biol. Chem. (1971) 246 (5), 1461-1467.

MORIN, E.

La Méthode - I. La nature de la Nature.

Ed. Seuil (1977).

MORROD, P.J., MARSHALL, A.G., CLARK, D.G.

Structural stability and composition of acetylcholinesterase purified by affinity chromatography from fresh electroplax tissue of Electrophorus electricus.

Biochem. Biophys. Res. Communic. (1975) 63 (1), 335-342.

MUENSCH, H., GOEDDE, H.W., YOSHIDA, A.

Human-Serum Cholinesterase subunits and number of active sites of the major component.

Eur. J. Biochem. (1976) 70, 217-223.

MUKHAMEDJANOV, E.K.

Détection des isoenzymes de la cholinestérase du sérum humain par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Lab. Dielo (1971) 1, 19-21. [en russe]

N

NAGY, I., SASHEGYI, J., KURCZ, M. BARANYAI, P.

Separation of serum cholinesterase isozymes by polyacrylamide gradient gel electrophoresis.

Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung. (1974) 9 (3), 209-212.

NEITLICH, H.W.

Increased plasma cholinesterase activity and succinylcholine resistance : A genetic variant.

J. Clin. Invest. (1966) 45, 380-387 .

NEMETHY, G., SCHERAGA, H.A.

The structure of water and hydrophobic bonding in proteins.

III - The thermodynamic properties of hydrophobic bond in proteins.

J. Phys. Chem. (1962) 66, 1773-1789.

NEVILLE, D.M., Jr.

Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system.

J. Biol. Chem. (1971) 246 (20), 6328-6334.

NGO, T.T., LAIDLER, K.J.

Immobilized electric eel acetylcholinesterase.

I - Kinetics of acetylcholinesterase trapped in polyacrylamide membranes.

Biochim. Biophys. Acta (1975 a) 377, 303-316.

NGO, T.T., LAIDLER, K.J.

Immobilized electric eel acetylcholinesterase.

II - Flow kinetics of acetylcholinesterase chemically attached to nylon tubing.

Biochim. Biophys. Acta (1975 b) 377, 317-330.

NIDAY, E., WANG, C.S., ALAUPOVIC, P.

Studies on the characterization of human erythrocyte acetylcholinesterase and its interaction with antibodies.

Biochim. Biophys. Acta (1977) 469, 180-193.

0

O'BRIEN, R.D.

Insecticides, Academic Press (1967) 32-34.

OGITA, Z.I.

Genetic control and epigenetic modification of human serum cholinesterase.

Isozymes Int. Conf., 3 rd. 1974, Academic Press (pub 1975) 2, 289-314.

OGSTON, A.G.

The space in a uniform random suspension of fibres.

Faraday Soc. Trans. (1958) 54, 1754-1757.

OKI, Y., OLIVER, W.T., FUNNEL, H.S.

Studies of esterases and multiple forms of cholinesterase in equine plasma.

Can. J. Physiol. Pharmacol. (1965) 43, 147-156.

ONCLEY, J.L.

Evidence from physical chemistry regarding the size and shape of protein molecules from ultracentrifugation, diffusion, viscosity, dielectric dispersion, and double refraction of flow.

Ann. N.Y. Acad. Sci. (1941) 41, 121-140.

ORNSTEIN, L.

Disc-electrophoresis. I - Background and theory.

Ann. N.Y. Acad. Sci. (1964) 121, 321-349.

P

PLUMMER, D.T., REAVILL, C.A., MCINTOSH, C.H.S.

Properties of the soluble and membrane-bound forms of acetylcholinesterase present in pig brain.

Croat. Chem. Acta (1975) 47 (3), 211-223.

PRAKASH, V., NANDI, P.K.

Association-dissociation behavior of sesame α -globuline in electrolyte solutions.

J. Biol. Chem. (1977) 252 (1), 240-243.

PRUNIER, J.H., BEARN, A.G., CLEVE, H.

Site of formation of the group-specific component and certain other serum proteins.

Proc. Soc. Exp. Biol. (1964) 115, 1005-1007.

R

REINER, E., SEUFERTH, W., HARDEG, W.

Occurrence of cholinesterase isoenzymes in horse serum.

Nature (1965) 205, 1110.

RESSLER, N.

A systematic procedure for the determination of the heterogeneity and nature of multiple electrophoretic bands.

Anal. Biochem. (1973) 51, 589-610.

REYNOLDS, J.A., TANFORD, C.

The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes.

J. Biol. Chem. (1970 a) 245 (19), 5161-5165.

REYNOLDS, J.A., TANFORD, C.

Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios.

Possible implication for the state of proteins in biological membranes.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1970 b) 66 (3), 1002-1007.

RIEGER, F., BENDA, P., BAUMAN, A., ROSSIER, J.

Immunological studies on globular and elongated forms of electric eel acetylcholinesterase. Effects of hydrolytic enzymes.

FEBS Lett. (1973 a) 32 (1), 62-68.

RIEGER, F., BON, S., MASSOULIE, J.

Phospholipids in "native" Electrophorus acetylcholinesterase.

FEBS Lett. (1973 b) 36 (1), 12-16.

RIGHETTI, P., DRYSDALE, J.W.

Isoelectric focusing in polyacrylamide gels.

Biochim. Biophys. Acta (1971) 236, 17-28.

RODBARD, D., CHRAMBACH, A.

Unified theory for gel electrophoresis and gel filtration.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1970) 65 (4) 970-977.

RODBARD, D., CHRAMBACH, A.

Estimation of molecular radius, free mobility, and valence using polyacrylamide gel electrophoresis.

Anal. Biochem. (1971) 40, 95-134.

RODBARD, D. KAPADIA, G., CHRAMBACH, A.

Pore gradient electrophoresis.

Anal. Biochem. (1971) 40, 135-157.

ROSENBERRY, T.L., CHANG, H.W., CHEN, Y.T.

Purification of acetylcholinesterase by affinity chromatography and determination of active site stoichiometry.

J. Biol. Chem. (1972) 247, 1555-1565.

ROSENBERRY, T.L., CHEN, Y.T., BOCK, E.

Structure of 11 S Acetylcholinesterase. Subunit composition.

Biochemistry (1974) 13 (15) 3068-3079.

ROSENBERRY, T.L.

Acetylcholinesterase.

Advances in Enzymol. (1975) 43, 103-218.

ROSENBERRY, T.L., RICHARDSON, J.M.

Structure of 18S and 14S acetylcholinesterase. Identification of collagen-like subunits that are linked by disulfide bonds to catalytic subunits.

Biochemistry (1977) 16 (16), 3550-3558.

ROSENBUSH, J.P., WEBER, K.

Subunit structure of aspartate transcarbamylase from E.coli.

J. Biol. Chem. (1971) 246 (6), 1644-1657.

S

SAEED, S.A., CHADWICK, G.R., MILL, P.J.

Action of proteases on human plasma cholinesterase isoenzymes.
Biochim. Biophys. Acta (1971) 229, 186-192.

SAWYER, W.H., PUCKRIDGE, J.

The dissociation of proteins by chaotropic salts.
J. Biol. Chem. (1973) 248 (24), 8429-8433.

SCHACHMAN, H.K.

Ultracentrifugation in biochemistry.
Academic Press. N.Y. (1959) .

SCHERAGA, H.A., MANDELKERN, L.

Consideration of the hydrodynamic properties of proteins.
J. Am. Chem. Soc. (1953) 75, 179-184.

SCHOENE, K., STEINHANSES, J., OLDIGES, H.

Protection against organophosphate poisoning in vivo and inhibition
of choline-acetyltransferase in vitro.
Biochem. Pharmacol. (1977) 26, 1821-1823.

SCHWARTZ, M.K.

Enzymes in cancer.
Clin. Chem. (1973) 19 (1), 10-22.

SCOTT, E.M., POWERS, R.F.

Human serum cholinesterase, a tetramer.
Nature, New Biol. (1972) 236, 83-84.

SCOTT, E.M., POWERS, R.F.

Properties of the C₅ variant form of human serum cholinesterase.
Am. J. Hum. Genet. (1974) 26, 184-194.

SCURZI, W., FISHBEIN, W.N.

The geometric mobility sequence in polyacrylamide gel electrophoresis
of polymeric proteins : its significance for polymer geometry and
electrophoretic theory.
Trans. N.Y. Acad. Sci. (1973) 35 (5), 396-416.

SEARS, D.W., KAZIN, A.R., MOHRER, J., FRIEDMAN, F., BEYCHOK, S.
Acquisition of the covalent quaternary structure of an Immuno-
globulin G molecule. Reoxidative assembly in vitro.
Biochemistry (1977) 16 (9), 2016-2025.

SEARS, D.W., BEYCHOK, S.
Acquisition of the covalent quaternary structure of an Immuno-
globulin G molecule. Theoretical reoxidation models.
Biochemistry (1977) 16 (9), 2026-2031.

SEGEL, I.G.
Multisite and Allosteric enzymes.
in Enzyme Kinetics, John Wiley N.Y. (1975) 346-353.

SENTHESHANMUGANATHAN, S., RAJARATNAM, M.
In vitro studies on human blood cholinesterase and its action
towards organophosphorus insecticides.
J. Natl. Sci. Council. Sri Lanka (1975) 3 (1), 51-53.

SHAW, C.R.
Subunit structure of proteins.
Brookhaven Symp. Biol. (1964) 17, 117-129.

SHAW, C.R.
Isoenzymes : classification, frequency, and significance.
Int. Rev. Cyto. (1969) 25, 297-332.

SHAW, D.J.
The electric double layer.
in Electrophoresis, Academic Press, N.Y. (1969) 4-26.

SHILOACH, J., BAUER, S., VLODAVSKY, I., SELINGER, Z.
Phospholipase-C from Bacillus cereus : production, purification,
and properties.
Biotechnol. Bioeng. (1973) 15, 551-560.

SIDELL, F.R., KAMINSKIS, A.

Influence of age, sex, and oral contraceptives on human blood cholinesterase activity.

Clin. Chem. (1975) 21 (10) 1393-1395.

SIDERS, D.B., BATSAKIS, J.G., STILES, D.E.

Serum Cholinesterase activity. A colorimetric microassay and some clinical correlations.

Am. J. Clin. Path. (1968) 50 (3), 344-350.

SIHOTANG, K.

Acetylcholinesterase and its association with lipid.

Eur. J. Biochem. (1976) 63, 519-524.

SILVER, A.

The Biology of Cholinesterases, North-Holland Pub. (1974).

SIMPSON, N.E.

Genetics of esterases in man.

Ann. N.Y. Acad. Sci. (1968) 151 (2), 699-708.

SINGER, S.J.

The properties of proteins in nonaqueous solvents.

Adv. in Protein Chemistry (1962) 17, 1-68.

SKAKOUN, A., DAUSSANT, J.

Estimation de la taille moléculaire de protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide à gradient de concentration en acrylamide : Etude critique de la méthode.

Bios. (1972) 3 (11), 503-508.

SLAYTER, E.M.

An electron microscope study of the conformational change in bovine serum albumin at low pH.

J. Mol. Biol. (1965) 14, 443-452.

SMITHIES, O.

Zone electrophoresis in starch gels : group variation in the serum proteins of normal human adults.

Biochem. J. (1955) 61, 629-641.

SQUIRE, P.G., MOSER, P. O'KONSKI, C.T.

The hydrodynamic properties of bovine serum albumin monomer and dimer.

Biochemistry (1968) 7 (12), 4261-4271.

STATFORD, W.F., SZENT-GYÖRGYI, A.G.

Physical characterization of myosin light chains.

Biochemistry (1978) 17 (4), 607-614.

STEELE, R.W., SMALLMAN, B.N.

Acetylcholinesterase of the house-fly head. Affinity purification and subunit composition.

Biochim. Biophys. Acta (1976) 445, 147-157.

STEFANOVIC, V., MANDEL, P., ROSENBERG, A.

Activation of Acetyl- and Butyrylcholinesterase by enzymatic removal of sialic acid from intact neuroblastoma and astroblastoma cells in culture.

Biochemistry (1975) 14 (24), 5257-5260.

STOKLOSA, J.T., LATZ, H.W.

Molecular weight determinations of proteins by polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate in just the sample solution.

Biochem. Biophys. Res. Communic. (1974) 58 (1), 74-79.

STOSICK, V., ZIMMERMANN, F.C., HELMBOLD, W., HARDEGG, W.

Fractionation of cholinesterase isoenzymes from horse serum by continuous-flow electrophoresis.

Pfluegers Arch. (1969) 310 (2), 95-100.

STRAUB, J.P.

The diagnostic value of some serum enzymes in liver diseases.

Neth. J. Med. (1975) 18 (6), 273-278.

SUCHEL, A., FAUVET, A.

Etude sur les intoxications par les insecticides organophosphorés.
J. Europ. Toxicol. (1974) 7 (5-6), 300-301.

SURGENOR, D.M., ELLIS, D.

Preparation and properties of serum and plasma proteins. Plasma cholinesterase.

J. Am. Chem. Soc. (1954) 76, 6049-6051.

SVENSMARK, O.

Human serum cholinesterase as a sialoprotein.

Acta Physiol. Scand. (1961) 52, 267-275.

SVENSMARK, O.

Enzymatic and molecular properties of cholinesterases in human liver.

Acta Physiol. Scand. (1963) 59, 378-389.

SVENSMARK, O., KRISTENSEN, P.

Isoelectric point of native and sialidase - treated human - serum cholinesterase.

Biochim. Biophys. Acta (1963) 67, 441-452.

SVENSMARK, O., HEILBRONN, E.

Electrophoretic mobility of native and neuraminidase-treated horse-serum cholinesterase.

Biochim. Biophys. Acta (1964) 92, 400-402.

SVENSMARK, O.

Molecular properties of serum cholinesterases.

Acta Physiol. Scand. (1965) 64 (suppl. 245) .

SZASZ, G. CZIRBESZ, Z., KIRALY, L., CSAKI, P.

Enzymaktivitätsbestimmungen ein Kindesalter. V. Serum cholinesterase beim nephrotischen Syndrom.

Acta Paediat. Acad. Sci. Hung. (1964) 5, 367-390.

TAI, J.Y., SEID, R.C., HUHN, R.D., LIU, T-H.

Studies on Limulus Amoebocyte lysate II .

Purification of the coagulogen and the mechanism of clotting.

J. Biol. Chem. (1977) 252 (14), 4773-4776.

TAKEDA, A., SAMEJIMA, T.

On the specific association of porcine erythrocyte catalase caused by formation of disulfide cross-links.

Biochim. Biophys. Acta (1977) 481, 420-430.

TANFORD, C.

Physical chemistry of macromolecules, John Wiley & Sons (1961).

TANFORD, C.

Protein denaturation.

Adv. Prot. Chem. (1968) 23, 121-282.

TANI, Y., NAGASAWA, T., SUGISAKI, H., OGATA, K.

Microbial cholinesterase. II - Purification and characterization of the cholinesterase of Pseudomonas aeruginosa A 16.

Agric. Biol. Chem. (1975) 39 (6), 1287-1294.

TAYLOR, P., JONES, J.W., JACOBS, N.M.

Acetylcholinesterase from Torpedo : Characterization of an enzyme species isolated by lytic procedures.

Mol. Pharmacol. (1974) 10, 78-92.

TENG, T.L., HARPST, J.A., LEE, J.C., ZINN, A., CARLSON, D.M.

Composition and molecular weights of butyrylcholinesterase from horse serum.

Arch. Biochem. Biophys. (1976) 176, 71-81.

TERZANI, G., NATALIZI, G., MARINUCCI, G.

Blood cholinesterase activity in acute and chronic hepatopathy.

Lab. Diagn. Med. (1968) 13, 139-151.

THOMAS, P., SUMMERS, J.W.

The biliary excretion of circulating asialoglycoproteins in the rat.

Biochem. Biophys. Res. Communic. (1978) 80 (2), 335-339.

THOMPSON, J.C., WHITTAKER, M.

Pseudocholinesterase activity in thyroid disease.

J. Clin. Path. (1965) 18, 811-812.

TOMOVA, E.L.

Multiple forms of cholinesterase in different part of the central nervous system.

Comptes Rendus Acad. Bulg. Sci. (1973) 26 (11), 1569-1572.

TROTTER, M.D., FAIRBURN, E.A.

Serum pseudocholinesterase in eczema.

Brit. J. Dermatol. (1966) 78, 469-471.

TSUJI, S.

On the chemical basis of thiocholine methods for demonstration of acetylcholinesterase activities.

Histochem. (1974) 42, 99-110.

TUCCI, A.F., SEIFTER, S.

Preparation and properties of porcine parotid Butyrylcholinesterase.

J. Biol. Chem. (1969) 244, 841-849.

U

UHLENBRUCK, Von G., HAUPT, H., REESE, I., STEINHAUSEN, G.

Serumcholinesterase als Modell eines Glykoproteins.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1977) 15, 561-564.

V

VAITON, C., BACQUES, C.

Connaissances actuelles sur la structure et le métabolisme des lipoprotéines.

Lyon Pharm. (1976) 27 (3), 233-258.

VANDERKOOI, G., CAPALDI, R.A.

A comparative study of the amino acid composition of membrane proteins and other proteins.

Ann. N.Y. Acad. Sci. (1972) 195, 135-138.

VAN ROSS, G., DRUET, R.

Uncommon electrophoretic pattern of serum cholinesterase.

Nature (1966) 212, 543-544.

VERJEE, Z.H., BEHAL, R., AYIM, E.M.

Effect of glucocorticoids on liver and blood cholinesterase.

Clin. Chim. Acta (1977) 81, 41-46.

VINCENT, D.

La cholinesterase sérique dans la néphrose lipoïdique.

Clin. Chim. Acta (1958) 3, 104-107.

VINCENT, D., PERRIER, H., ROUZIOUX, J.M.

Isoenzymes de la cholinestérase sérique chez l'homme et chez quelques espèces de singes.

C.R. Soc. Biol. Lyon (1970) 164, 860-863.

VINCENT, D., PERRIER, H., ROUZIOUX, J.M.

Sur les isoenzymes de la cholinestérase sérique chez quelques espèces animales.

C.R. Soc. Biol. Lyon (1970) 164, 1767-1769.

VINCENT, D., PERRIER, H., ROUZIOUX, J.M.

Isoenzymes des cholinestérases.

J. Med. Lyon (1971) 5 oct., 1187-1195.

VOSS, G.

The fundamental kinetics of cholinesterase reaction with substrates and inhibitors in an automated, continuous flow system.

Residue Review (1968) 23, 71-95.

W

WARREN, L., SPEARING, C.W.

Mammalian sialidase (neuraminidase).

Biochim. Biophys. Res. Communic. (1960) 3 (5), 489-492.

WAUGH, D.F.

Protein-protein interactions.

Advances in Prot. Chem. (1954) 9, 325-437.

WAY, R.C., HUTTON, C.J., KUTTY, K.M.

Relation between serum cholinesterase and low density lipoproteins in children with nephrotic syndrome.

Clin. Biochem. (1975) 8 (2), 103-107.

WEBER, K., OSBORN, M.

The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

J. Biol. Chem. (1969) 244 (16) 4406-4412.

WEBER, K., KUTER, D.J.

Reversible denaturation of enzymes by sodium dodecyl sulfate.

J. Biol. Chem. (1971) 246 (14), 4504-4509.

WEBER, K., PRINGLE, J.R., OSBORN, M.

Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS - acrylamide gel.

Methods in Enzymol. (1972) 26 part C, 3-27.

WEBER, M. TRELA, F.M.

Studies on the cholinesterase isoenzymes of human blood serum.

Folia Biol. (KRAKÓW) (1976) 24 (2), 223-229.

WHITTAKER, M., SPENCER, R.

Plasma cholinesterase variants in patients having lithium therapy.

Clin. Chim. Acta (1977) 75, 421-425.

WILDE, C.E., KEKWICK, R.G.O.

The aromatic esterase activity of human serum.
Biochem. J. (1962) 83, 39p-40p .

WILLIAM, D.A., BOLTZ, D.F.

A spectrophotometric study of the determination of copper with
dithiooxamide in acidic media.
Anal. Letters (1975) 8 (2), 103-114).

WILSON, I.B., BERGMANN, F., NACHMANSOHN, D.

Acetylcholinesterase. X. Mechanism of the catalysis of acylation
reactions.
J. Biol. Chem. (1950) 186, 781-790.

WILSON, I.B.

Acetylcholinesterase : Further studies of binding forces.
J. Biol. Chem. (1952) 197, 215-225.

WILSON, I.B.

The active surface of the serum esterase.
J. Biol. Chem. (1954) 208, 123-132.

WOLD, F.

Bifunctional reagents.
in Methods in Enzymol. (1972) 12, 617-640.

WRIGLEY, C.

Gel electrofocusing - A technique for analyzing multiple protein
samples by isoelectric focusing.
Sci. Tools (1968) 15 (2), 17-23.

Y

YON, J.

Structure et dynamique conformationnelle des protéines.
Hermann ed., Paris (1969) .

Z

ZAIS, D.P., ROBERTS, R.C.

System for simplified discontinuous-gradient polyacrylamide-gel
electrophoresis.

Clin. Chem. (1977) 23 (3), 590-592.

ENFIN ! DE QUOI AURIONS-NOUS
L'AIR SI, NOUS AUTRES HOMMES
DE SCIENCES, NOUS DONNIONS
LE REGRETTABLE SPECTACLE
DU DOUTE, DE L'INCERTITUDE ET
DE L'INDÉCISION ?

BIEN PARLÉ, DOC.
ET MERCI POUR TOUS.

